

# A GYÓGYSZERKUTATÁS MŰSZERES MÓDSZEREI



A kiadvány a Magyar Tudományos Akadémia támogatásával készült.

Szerkesztő: Sohár Pál, professzor emeritus, az MTA rendes tagja  
Olvasószerkesztő: Szalay Roland, PhD, egyetemi adjunktus  
Tördelőszerkesztő: Nagy Tibor Zsigmond, PhD

Lektorok:

Kubinyi Miklós, DSc, egyetemi tanár  
Nyulászi László, DSc, egyetemi tanár

ISBN 978-963-9970-61-8

Kiadja az 1907-ben alapított Magyar Kémikusok Egyesülete,  
1015 Budapest, Hattyú u. 16. II/8  
[www.mke.org.hu](http://www.mke.org.hu)

Első magyar nyelvű kiadás: 2015

© Sohár Pál (szerk.) 2015

# A GYÓGYSZERKUTATÁS MŰSZERES MÓDSZEREI

*Szerkesztő*  
SOHÁR PÁL



Magyar Kémikusok Egyesülete, Budapest

Minden jog fenntartva, beleértve a sokszorosítás,  
a nyilvános előadás, a rádió- és televízióadás,  
valamint a fordítás jogát,  
az egyes fejezeteket illetően is.

Printed in Hungary

A kiadásért felelős  
a Magyar kémikusok Egyesületének ügyvezető igazgatója  
Olvasószerkesztő: Szalay Roland  
Felelős szerkesztő: Sohár Pál  
A nyomdai munkálatokat a Europrinting Kft. végezte  
Felelős vezető: Endzsel Ernő  
Budapest, 2015



## Előszó

Túlzás nélkül állíthatjuk, hogy a magyar gyógyszerkutatás nemzetközi színvonalú, az elmúlt száz évben kialakult a kutatók kritikus tömege is. Orvosok, gyógyszerészek, szerves és elméleti kémikusok, biológusok, matematikusok és más szakterületek művelői, sok száz kiválóan felkészült specialista intenzív munkával dolgozik új gyógyszerek kifejlesztésén, illetve a meglévők további javításán. Indokolt tehát, hogy fontos szakmai vitáikat anyanyelvükön folytassák le, ehhez viszont szükség van a szaknyelv folyamatos ápolására és a magyar nyelven elérhető szakirodalom ésszerű gyarapítására. Ez a kötet a gyógyszerkutatás legfontosabb műszeres módszereit tekinti át, lehetőséget teremt a kezdőknek, illetve egy-egy szakterület részleteiben nem tájékozott kutatóknak, de a specialistáknak is, hogy ismereteiket bővítsék és elmélyítsék. Nem véletlen, hogy a fejezetek közül az első a folyadékromatográfiával foglalkozik, ez ugyanis mára olyan nagymértékben terjedt el a vizsgálati módszerek között, hogy még annak a gyógyszerkutatónak is tudnia kell róla valamit, aki nem kifejezetten kémiai analízissel foglalkozik. A spektrometria különböző ágai ugyancsak nélkülözhetetlenek, ezek tárgyalása teszi ki a könyv döntő részét. Lehetővé teszi a tájékozódást a legmodernebb módszerek között, melyek alkalmazása hazai viszonyok között is magas színvonalon lehetséges. A röntgendiffrakció néhány évtizede még kuriózumnak számított, ma már biztosan állíthatjuk, hogy a gyógyszerkutatás egyik nélkülözhetetlen segítőtje. Éppúgy, mint a folyadékfázisú szerkezetvizsgálat kiemelkedő jelentőségű módszere, a mágneses magrezonancia-spektroszkópia, mely az oldatfázisban kialakuló viszonyokat képes korábban elképzelhetetlen mélységben és pontossággal leírni. Bár az e könyvben megfelelő tömörséggel és érthetően összefoglalt ismeretek az internet vagy nyomtatott folyóiratok és könyvek segítségével angol nyelven is viszonylag könnyen elérhetők, a magyar tudományos nyelv ápolása megköveteli egy ilyen mű kiadását. Jó szívvel ajánlom mindenkinek, aki professzionális szinten kíván foglalkozni a gyógyszerkutatással.

*Náray-Szabó Gábor*

## A szerkesztő előszava\*

A Magyar Kémikusok Egyesülete kezdeményezte egy olyan könyv kiadását, amely a terület szakemberei számára összefoglalja a gyógyszerkutatásban alkalmazható legfontosabb műszeres módszerek alapvető elméleti ismereteit, mérés technikai tudnivalóit és alkalmazási lehetőségeit. A kiadvány felkért szerkesztőjeként kikérve a három nagy hazai gyógyszergyár illetékes szakembereinek javaslatát a tervezett könyv tematikáját, illetve a tárgyalandó műszeres módszereket illetően, több tucat műszeres módszert felsoroló lista állt össze. Mivel valamennyi javasolt módszer tárgyalása messze meghaladta volna az ésszerűség és a reális lehetőségek kereteit, a legfontosabbnak tekinthetőkre szűkítve a listát, tíz fejezet megírását tűztük ki célul: elválasztástechnika, termogravimetria, pásztázó elektronmikroszkópia, tömegspektrometria, diffrakciós módszerek, emissziós spektroszkópia, elektronspektroszkópia és minőségbiztosítás, IR-spektroszkópia, NIR-spektroszkópia és NMR-spektroszkópia.

A műszeres módszerek meghonosodása és elterjedése Magyarországon a múlt század második harmadának kezdetével esik egybe. Mint minden újdonság, e módszerek is csak fokozatosan, gyakran bizalmatlanságot, sőt ellenállást legyőzve hódították meg a későbbi felhasználókat, s ezen belül a gyógyszerkutatással foglalkozó szakembereket. Az egyes műszeres módszerek hazai úttörői nemcsak elődök, tanítómesterek nélkül kellett elsajátítsák ezek elméleti alapjait, gyakorlati ismereteit és felhasználási területeit, de el kellett oszlassák a kezdetben fennálló bizalmatlanságot, meg kellett győzzék kutató kollegáikat a mérések hitelességéről és a segítségükkel szerzett információk megbízhatóságáról.

És bizony előfordult, hogy a mérési eredményekből levont következtetések tévesnek bizonyultak. Egyes mérési módszerek mindmáig, de eredetileg szinte valamennyi, csak közvetett adatokat, könnyen félreértelmezhető információkat szolgáltatott és a téves interpretáció lehetősége mindig fennállt. Egy-egy hibás következtetés, téves szerkezet sok sikeresen megoldott kutatási feladatot feledtetett és élesztette újra az adott módszer iránti idegenkedést.

Ellenkező előjelű veszély is fennállt: egy-egy kutatási probléma sikeres megoldása túlzott elvárásokat szült és olyan kérdések tisztázását is elvárták a szakembertől, amelyekre a módszer alkalmatlan volt. E szkillák és karibdiszek között lavírozva kellett a szerkezetkutatónak, spektroszkópus

\* Az MTA 2012. évi közgyűléséhez kapcsolódó osztályülésen elhangzott előadás nyomán [*Magyar Kémiai Folyóirat* 2013, 119, 4.]

szakembernek módszere számára kollégáit megnyerni, miközben eleinte maga is gyakorlatlan kezdőként ismerkedett a számára is csak fokozatosan feltáruló lehetőségek és csapdák világával.

A műszeres módszerek közül elsőként az ultraibolya és látható (UV-VIS) spektroszkópia jelent meg a hazai kutatásokban. A Szegedi Egyetem Fizikai Kémiai Tanszékének vezetője, Kiss Árpád kezdeményezett UV-spektroszkópiái és kvantumkémiai kutatásokat az 1920-as évek közepén. Főként átmenetifém-vegyületek, fémkomplexek vizsgálatával foglalkozott.

Az 1930-as évek elején a Budapesti Műszaki Egyetemen Schmid Rezső honosította meg az UV-spektroszkópiái kutatásokat, kétatomos molekulák spektrumának vizsgálatára koncentrálna. Rövid pályafutása nemcsak ahhoz volt elegendő, hogy az elméleti kutatásokban és a spektroszkópiái méréstechnikában érjen el jelentős eredményeket, de ahhoz is, hogy évtizedeken át sikeresen működő, sok kiváló szakembert felnevelő iskolát teremtsen. Kutatásait többek között Budó Ágoston és Gáspár Rezső, a BME Atomfizikai Tanszékén Bay Zoltán és Kovács István, a Fizikai Kémia Tanszéken Varsányi György folytatták. 1949-től Kovács István a kétatomos molekulák elméleti vizsgálatát a KFKI Optikai Spektroszkópiái Laboratóriuma vezetőjeként is folytatta.

A gyógyszeripar 1962 táján „fedezte fel” az UV-spektroszkópiát. A Richter gyárban Bayer Jenő és Görög Sándor vezették be az UV-módszert. A B<sub>12</sub> vitamin analitikájában és szteroidkutatásokban használták fel a mérési eredményeket. Velük egy időben Horváth Gábor a Chinoin Gyógyszergyárban kezdett foglalkozni UV-mérésekkel és ezek eredményeit heterociklusok szerkezetigazolásában, és benzol-származékoknál a szubsztitúciós hatások tanulmányozásában hasznosította. A terület elismert szaktekintélye, Láng László UV-spektrumatlaszt szerkesztett, amelynek az Akadémiai Kiadó 24 kötetét jelentette meg.

A hazai krisztallográfiai kutatások elindítója Náray-Szabó István volt, aki a Nobel-díjas Bragg mellett eltöltött külföldi tanulmányútról hazatérve, 1930-ban a Szegedi Egyetemen röntgendiffrakciós laboratóriumot hozott létre. 1938-tól a II. világháború végéig a Műegyetem Fizikai Kémiai Tanszékének vezetőjeként folytatta, Sasvári Kálmán munkatársával, kutatásait. Konceptióis per áldozataként évekre meg kellett szakítania kutatómunkáját és karrierjének folytatására csak 1956-tól nyílt lehetősége az MTA Központi Kémiai Kutatóintézetben. Pályafutásának utolsó másfél évtizede elegendő volt arra, hogy kutatócsoportjával egy nemzetközileg elismert iskolát teremtsen, amelynek vezető kutatói, közöttük csoportvezetőként utódja Kálmán Alajos, s mások mellett Czugler Mátvás,

Párkányi László és Argay Gyula valamennyien tudományterületük kiemelkedő szaktekintélyeivé váltak.

A KKKI kutatócsoportja évtizedeken át a krisztallográfiai kutatások egyetlen hazai bázisaként széleskörű együttműködést alakított ki szinte valamennyi számottevő magyarországi kémiai kutatóhellyel, közöttük a gyógyszergyárakkal és ipari gyógyszerkutató intézetekkel, így a Chinoinnal is. A Chinoin szakembere, Simon Kálmán a KKKI-beli kutatókkal, az ott működő mérőberendezéseket felhasználva, közösen oldotta meg a gyári szerkezetkutató feladatokat és csak 1991-ben került sor saját műszer beszerzésére a vállalatnál. Két évvel később, 1993-ban az ELTE Kémiai Tanszékcsoportjában Náray-Szabó Gábor vezetésével krisztallográfiai laboratóriumot létesítettek és helyeztek üzembe egy modern röntgendiffraktométert. Újabb három év elteltével, 1996-ban a Debreceni Egyetem is csatlakozott a hazai röntgenkészülék-tulajdonosokhoz. Ez a műszer máig az egyetlen vidéken üzemelő ilyen berendezés. Működtetője Bényei Attila a Fizikai Kémia Tanszéken.

Az elválasztástechnika, elsősorban a folyadék- és gázkromatográfia, ma már minden kémiai laboratórium nélkülözhetetlen tartozéka. A vegyész munkát segítő műszeres módszerek fegyvertárát hazánkban az 1930-as évek utolsó harmadától kezdve gyarapítja. Az első, 1937-ben megjelent kromatográfiával foglalkozó tankönyvet a Pécsi Egyetem oktatói, Cholnoky László és Zechmeister László írták. E témáról Szepesi László több könyvet is írt 1961 és 1986 között. A tudományterület fél tucat idegen nyelvű kiadásban is megjelent monográfiája az ioncserélőkről készült, szerzője Inczedy János.

A BME Analitikai Tanszékén 1962 óta foglalkoznak termoanalitikai vizsgálatokkal. Ezek kezdeményezője Paulik Ferenc volt, aki testvérével, Jenővel fejlesztette ki a széles körben elterjedt termogravimétert. Ez a kisműszer valódi „hungarikum”-nak tekinthető.

Tömegspektrometriával hazánkban elsőként Cornides István az ELTE Kísérleti Fizikai Tanszékén, az 1950-es évek elejétől foglalkozott. Elsősorban a műszerfejlesztésre és a mérés technikára összpontosította kutatásait, de az oktatás is igen fontos szerepet kapott tevékenységében. Résztvétele és vezető szerepe az 1956-os forradalomban és szabadságharcban kettészakította kutatói karrierjét. 1957-ben több hónapra bebörtönözték. Szabadulását követően Kazincbarcikán a Borsodi Vegyi Kombinátban műszerész-szakt munkásként dolgozott. 1966-tól a Bányászati Kutató Intézetben folytathatta kutatómunkáját nyugdíjazásáig. Összefogta, szervezte, tanította és irányította a hazai tömegspektroszkópus közösséget,

s bár maga kémiai szerkezetkutatással nem foglalkozott, az e téren működő szakemberek szinte kivétel nélkül az ő tanítványaként ismerkedtek meg a szakterülettel.

Az 1960-as évek elejétől az MTA KFKI-ban indultak MS-kutatások. Matus Lajos és Opauszky István izotóparány-meghatározásra, fémanalitikai célra és gázfázisú reakciók tanulmányozására alkalmazták a tömegspektrometriát, de esetenként szerves vegyületek szerkezetvizsgálatára is sor került laboratóriumukban. Rendszeres szerkezetfelderítést szolgáló mérések 1963-tól az MTA KKKI Szerkezeti Kémiai Kutató Laboratóriumában Tamás József vezetésével folytak. A labor műszerépítés és méréstechnika terén nélkülözhetetlen szakembere Ujszászy Kálmán volt, jelenlegi vezetője Vékey Károly, akinek érdeklődése egyre nagyobb mértékben fordult a biológiai, sőt orvosi problémák irányába.

Az MS-műszerek és mérési módszerek az elmúlt évtizedekben igen látványos fejlődésen mentek át (pl. újfajta ionizációs eljárások, MALDI, TOF, stb., kapcsolt IR-MS, NMR-MS, GC-MS, tandem-mérések). Ennek, a kis anyagigénynek és az igen széleskörű, a kémia szinte valamennyi ágát lefedő alkalmazási lehetőségeinek köszönhetően a kémiai szerkezetkutatás – NMR és IR spektroszkópia, valamint az egykristály-diffrakció mellett – legfontosabb segédeszközzé fejlődött. Az iparban már 1960-ban sor került MS-mérésekre: az Egyesült Izzóban Tahy Péter gázanálízisre használta a tömegspektrometriát, 1967-ben a MÁFKI-ban Décsy Zoltán és Prókai László végeztek MS-méréseket a POTE karotinoidkutatásaiba bekapcsolódva. 1970-ben a BME Szervetlen Kémiai Technológiai és Analitikai Tanszékein, az ELTE Általános és Szervetlen Kémiai Tanszékén, továbbá a Gyógyszerkutató Intézetben indultak MS-vizsgálatok. A BME-n Szepesy László az MS-t, mint GC-detektort alkalmazta, Balla József GC-MS-méréseket kezdeményezett. Az ELTE-n Borossay József a gázanálízisben és szilíciumvegyületek szerkezetvizsgálatában alkalmazta a módszert. A GYKI-ban a 60-as évek végén létesült MS-labor, Horváth Gyula irányításával. A KLTE 1975 körül kapcsolódott be a hazai MS-vizsgálatokba Dinya Zoltán közreműködésével, aki később az MS környezetkémiai alkalmazásainak területére koncentrálna kutatásait.

Az UV-VIS spektroszkópiát követően, a leggyorsabban elterjedt és a kémia szinte minden területén felhasználható műszeres módszer kétség kívül az infravörös spektroszkópia. A molekulák biztonságos azonosításától kezdve (az IR-spektrum átlagosan 30-50 sávból áll, ennyi független, az olvadásponttal azonos értékű jellemző adat együttesét joggal nevezzük a molekulák ujjenyomatának), a funkciós csoportok felismerésén át, összetétel-meghatározásra, kinetikai vizsgálatokra, reakciómechanizmusok

felderítésére, tisztaság-ellenőrzésre, és sok más célra alkalmasak az IR-spektrumból nyerhető információk. A mérőműszer nem túl költséges, a méréstechnika egyszerű, az üzemeltetés különleges felkészültséget, speciális műszaki feltételeket nem igényel. Nem csoda, hogy a módszer elterjedése igen gyorsan játszódott le az első IR-spektrométerek 1957-ben megtörtént üzembe helyezését követően. Az 1960-as évek végére minden fontosabb hazai kémiai kutatóhelyet felszereltek IR-készülékekkel. Az IR-szakemberek száma jóval lassabban növekedett, mert az IR-spektrumok sikeres és részletesebb értelmezése nagy gyakorlatot, tapasztalatot és alapos elméleti felkészülést követel. Ezért tág tere nyílt az együttműködéseknek néhány hazai IR-szaktekintély és a népes felhasználói kör, a preparatív vegyészek között.

A két első IR-kutatócentrum a Varsányi György vezette BME-KKKI közös laboratóriuma és a veszprémi MÁFKI, ahol Bor György volt a kutatómunka irányítója. E két kutatóhelyen 1957-ben helyeztek üzembe egy-egy, a nyugati világban már akkor elavultnak minősülő, egysugaras berendezést. Varsányi főként egyszerű benzolszármazékok rezgési spektroszkópiájával, a benzol-normálrezgések hozzárendelésével, Bor György fémkarbonilok szerkezetvizsgálatával foglalkozott. Varsányi nevéhez fűződik az első hazai egyetemi IR-tárgyú speciális előadás (a BME vegyészkarán az 1956/7-es tanévtől) és nagysikerű „alapkönyve”, több száz benzolszármazék IR-sávjainak asszignációjával.

Az 1956-os szabadságharcot és forradalmat követően, 1959-ben egy szovjet gyorssegély keretében három egysugaras készülék érkezett – használhatatlan állapotban – az Országba, amelyek a szegedi egyetem Fizikai-Kémiai Tanszékére, a Richter-gyárba és a Gyógyszerkutatóba kerültek. Sohár Pálnak, egy kitűnő műszer-szakértő, Kliburszky Béla közreműködésével, egyévnyi megfeszített munkával sikerült a GYKI műszerét üzemképessé tenni. Következményként Sohár Pált megbízták a másik két készülék megjavításával is. E megbízások sikeres teljesítése kiinduló pontjává vált több, munkahelyen kívüli tudományos együttműködésnek.

Az egysugaras készülékekkel átlagosan egy teljes napi munkát követelt egy használható IR-spektrum elkészítése. Szerencsére ez a korszak nagyon rövid ideig tartott: 1960-ban az ELTE Szerves Kémiai Tanszéke kapott két-sugármertes készüléket, amelyet a Tanszéken és a GYKI-ban folyó kutatások kiszolgálására Ruff Ferencsel e sorok írója működtetett. 1962-ben a KFKI, 1964-ben a KLTE Szerves Kémiai Tanszéke jutott IR-készülékhez. A KFKI-ban Mink János és Szőke József végezték az IR-vizsgálatokat, a KLTE Szabó Sándorra és Dinya Zoltánra bízta a műszer



működtetését, akik az ELTE laborban ismerkedtek meg a műszerrel és az IR szerkezetkutatásbeli alkalmazásának tudnivalóival.

Arra nincs lehetőség, hogy továbbkövessük az IR-spektroszkópia hazai térnyerését, de, mint említettem, néhány évvel később már minden jelentősebb hazai kutatóhelyen működött IR-berendezés.

A napjainkban vitathatatlanul legfontosabb, a kémia minden területén és valamennyi természettudományban legerjedtebben alkalmazott nagyműszeres módszer a mágneses magrezonancia (NMR-) spektroszkópia. Amíg a többi műszeres mérés technika hosszabb-rövidebb idő után rutinszerű részévé vált a kutatásoknak, addig az NMR-spektroszkópia időről-időre megújult, mert az elméletben és főként a mérés technikában olyan gyors és gyökeres változásokkal járó fejlődés ment végbe (szupravezető mágnes, pulzusgerjesztés, FT-adatfeldolgozás), ami az alkalmazások és a megoldható problémák szempontjából addig elképzelhetetlen új lehetőségek sokaságát nyitotta meg a kutatás számára (multinukleáris-NMR, két- és többdimenziós mérések, mérésautomatizálás, stb.).

Az 1930-as évek végétől Simonyi Károly munkatársaival a BME Bay Zoltán vezette Fizikai Intézetében atomsugarakkal atommagok giromágneses tényezőjének meghatározásával foglalkozott. Ezek a mérések a nemzetközi kutatások élvonalába tartoztak és előkészítői voltak az NMR-spektroszkópiának. A háború azonban megtörte a kezdeti lendületet, s évekre megszakadtak a sikeresnek induló munkák.

A háború után az ELTE Fizikai Intézetben, később, oda áttelepülve, a Központi Fizikai Kutatóintézetben munkatársaival, Faragó Péterrel, E. Gécs Máriával és Mertz Jánossal Bay Zoltán kezdeményezte, illetve folytatta a hazai NMR-kutatásokat. Házilag barkácsolt szélessávú műszerekkel, szilárdtest-fizikai problémákkal foglalkoztak. A műszerépítésben is résztvevő Tompa Kálmán vezetésével különböző fémekben és ötvözetekben a töltéssűrűség-oszcillációt tanulmányozták. Kommersz készülékhez csak évtizedek múltán (1973-ban) jutottak. Kutatómunkájuk relaxációs idők meghatározására, illetve szövetminták *in vitro* mérésére összpontosult. A KFKI-s csoport, bár ők kémiai problémák vizsgálatával nem foglalkoztak (ezt nem is tették lehetővé mérőberendezéseik), konferencia- és ismeretterjesztő előadásokkal és oktatási tevékenységükkel úttörői voltak a hazai NMR-spektroszkópiának.

Hazánkban, több mint egy évtizedes késéssel, 1964-ben nyílt lehetőség a kémiai kutatásokat szolgáló NMR-mérésekre. Ekkor helyeztek üzembe egy 60 MHz-es kommersz készüléket a KKKI-ban, amelyen Neszmélyi András és Radics Lajos dolgoztak. Elsősorban az intézetükben felmerült problémák tisztázásában működtek közre, de az egy ideig egyetlen hazai

nagyfelbontású készülék működtetőiként több magyar kutatóhellyel alakítottak ki együttműködést. Kezdeti tudományos eredményeik közül kiemelkedik a gátolt rotáció és a nitrogén-heterociklusok kvaternerezési reakcióinak sztereokémiai tanulmányozása. Radics más kutatóhelyeken szakértőként, egyik műszerforgalmazó cégnél szoftverfejlesztőként is tevékenykedett, Neszmélyi a 70-es évektől a természetes anyagok és szénhidrátok vizsgálatára és a  $^{13}\text{C}$  NMR-spektroszkópiára, illetve a pulzus-technikák hazai bevezetésére összpontosított.

A gyógyszeriparban, közelebről a Gyógyszerkutató Intézetben, 1966-ban e könyv szerkesztőjének vezetésével indultak NMR-kutatások. Egy igen gyenge teljesítményű 60 MHz-es műszert előbb (1972-ben) sikerült felcserélni egy jobb teljesítményű, majd pedig egy ugyancsak 60 MHz-es, de korszerű és speciális kiegészítő vizsgálatokra (multinukleáris, DR- és VT-mérés, számítógépes spektrumakkumuláció) is alkalmas berendezésre. Az NMR-munkacsoport széleskörű hazai és nemzetközi együttműködéseket alakított ki, és mintegy iskolaként is működött. Számos kiváló NMR-szakember pályafutása indult innen, és több tucat hazai és külföldi vendégkutató, közöttük későbbi kiváló szaktekintélyek, ismerkedtek meg az NMR-spektroszkópiával a munkacsoportban. A szerkesztő nevéhez fűződik az első magyarországi egyetemi NMR-kurzus, amelyet az ELTE Kémiai Intézetében, illetve kezdetben az 1969/1970-es tanévtől a Szerves Kémiai Tanszéken, négy évtizeden át, két féléves speciális kollégiumként adott elő.

Az 1964-1970-es évek a 60 MHz-es műszerek korszakát jelentik Magyarországon. A KKKI-t és a GYKI-t követően, 1968-ban a BME Szerves Kémiai Tanszékén helyeznek üzembe egy 60 MHz-es berendezést, amelyen Kolonits Pál dolgozott. Az ELTE Szerves Kémiai Tanszékén 1970-től végzett NMR-méréseket Mezey Pál, Ósapayné Balogh Klára és Kövesdi István. 1971-től a POTE és a MÁFKI csatlakozik az NMR-készülék-tulajdonosokhoz. Pécsent Aradi Ferenc és Földesi András az első NMR-szakemberek, a MÁFKI-nál Szalontay Gábor, aki a Veszprémi Egyetem számára is végzett méréseket. Az egyetemek közül utolsóként a SZOTE helyezte üzembe 60 MHz-es spektrométert, 1973-ban, s itt Dombi György volt az NMR-specialista. A nagy gyógyszergyárak is felismerik az NMR jelentőségét és sorra saját mérőeszközről gondoskodnak. A Chinoin már 1970-ben üzembe állít NMR-készüléket, s ezen Dvortschák Péter, később Podányi Benjámint dolgozik. A Richter 1964-ben csatlakozik az NMR-spektrométereket működtetők táborához, s a műszernek itt ifj. Szántay Csaba a gazdája. Az EGYT 1976-ban helyez üzembe egy 60



MHz-es műszert, amellyel elsőként Kis-Tamásné Kovács Ágnes végezte a méréseket.

Az 1970-es évtized a 100 MHz-es, elektromágnessel működő Fourier-transzformációs berendezések korszaka. Az első ilyen készüléket a Debreceni Egyetem (akkor KLTE) Szerves Kémiai Tanszéke kapta és Szilágyi László működtette. Hozzá a 80-as évek elején csatlakozott E. Kövér Katalin és Batta Gyula. Az NMR-labor regionális igényeket is ellátott és igen hamar behozta a kezdeti lemaradást: rövid idő alatt a legjelentősebb hazai NMR-kutatóhelyek közé emelkedett. A rezonancia-módszerek oktatása a 70-es évek közepétől folyik Debrecenben és fontos szerepet játszik a graduális és posztgraduális képzésben. Kutatásaik középpontjában a szénhidrátok, antibiotikumok és peptidek szerkezet-felderítése, illetve molekuladinamikai tanulmányozása áll, de metodikai munkáik, így a heteronukleáris NOE-, a szelektív és nem szelektív, egy- és kétdimenziós pulzusszekvenciákat alkalmazó mérési technikák fejlesztése is nemzetközi elismerést vívott ki.

A KKKI 1973-ban, a GyKI 1976-ban jutott FT-NMR berendezéshez. Ez mindkét intézményben a rutinszerű hozzáférést tette lehetővé a  $^{13}\text{C}$  NMR-mérésekhez, jelentősen bővítve ezzel a megoldható szerkezetkutatási problémák körét. Lehetővé vált nukleotidok, bonyolultabb antibiotikumok és peptidek vizsgálata is, amelyeket a KKKI-ban az időközben Peredyné Kajtár Máriával és Baitzné Gács Eszterrel, később Sándor Péterrel kibővült NMR-csoport végzett. A BME Analitikai Tanszékén 1978-ban helyeztek üzembe 100 MHz-es készüléket, amely a labort vezető Tóth Gábor számára kutatásainak kiterjesztését tette lehetővé, többek között  $^{15}\text{N}$  NMR-vizsgálatokra.

Az 1980-as évek elején megjelentek Hazánkban is a nagyterű, szupravezető mágnessel működő számítógép-vezérelt csúcsműszerek. Elsőként, 1981-ben Debrecenben, a KLTE-n kezdett működni egy 200 MHz-es, s az EGIS-ben egy 250 MHz-es nagyterű NMR-spektrométer. A KKKI 1985-ben szerzett be egy Varian 400 MHz-es készüléket. Ezután ismét nagyobb szünet következett, amíg 1991-ben a veszprémi, 1992-ben pedig a szegedi egyetemen installáltak egy-egy 300, illetve 400 MHz-es berendezést, majd 1995-ben az első hazai 500 MHz-es spektrométert az ELTE Kémiai Tanszékcsoportjánál. Ettől kezdve sűrűsödtek a hazai csúcsműszer-beszerzések és mára minden jelentősebb kémiai kutatóhely fel van szerelve nagyterű NMR-készülékkel. Ezek pusztá felsorolása is ésszerűtlenül megnövelné e rövid áttekintést a műszeres módszerek elterjedéséről és térhódításáról Magyarországon.

Az NMR-spektroszkópia mára nélkülözhetetlenné és mindennapos rutinmódszerré vált nemcsak a kémiában, de a biológiában (gondoljunk csak a biopolimerek, peptidek, enzimek szerkezetfelderítésére) és az orvostudományban, sőt az orvosi diagnosztikában is (MRI), s ha nem is tartunk ott, mint pl. Japán, ahol az ipari minőségbiztosítást többtucat NMR műszernek otthont adó, városrésznyi óriáslaborok szolgálják ki, az a súlyos műszerezettségbeli lemaradás, ami a hazai kémiai szerkezetkutatást sok évtizeden át sújtotta, jelentősen mérséklődött.

E könyv korántsem nyújt teljes áttekintést, sem a tárgyalt módszereket, sem pedig az előszóban név szerint is megemlített kiemelkedő szakembereket illetően, s ezért elnézést kér a szerkesztő. A könyv terjedelmét az ésszerű és megszabott keretek közé szorítva többre nem volt mód.

A szerkesztő reményei szerint e kiadvány így is, nemcsak a közvetlenül felhasználók, a gyógyszerkutatással foglalkozó kollégák számára nyújt segítséget, hogy tájékozódjanak az egyes mérési módszerek kínálta lehetőségekről a saját munkájukbeli alkalmazások terén, de a tárgyalt szakterületek specialistái is haszonnal forgathatják épp úgy, mint a kémiát tanuló egyetemi hallgatók és doktoranduszok, akik számára tankönyvként, tanulmányaikhoz jó segédeszközzül szolgálhat.

2015. március

a szerkesztő

# Tartalomjegyzék

Előszó.....	i
A szerkesztő előszava .....	ii
Rövidítésjegyzék.....	xvii
1. Folyadékkromatográfia .....	1
1.1. A folyadékkromatográfia alapjai .....	1
1.1.1. Alapfogalmak, alapösszefüggések.....	3
1.2. Fejlesztési irányok a folyadékkromatográfiában.....	7
1.2.1. Elvárások egy gyors kromatográfiás mérésekre alkalmas készülékkel szemben.....	9
1.2.2. Fejlesztések a kolonnatechnológiában.....	15
1.2.2.1. Teljesen porózus, kis szemcseátmérőjű töltetek.....	15
1.2.2.2. Héjszerkezetű (mag-héj) töltetek.....	21
1.2.2.3. Monolit kolonnák .....	26
1.2.2.4. Szemcsés, teljesen porózus, héjszerkezetű és monolit kolonnák összehasonlítása.....	31
1.2.3. Nagyhőmérsékletű elválasztások.....	37
1.3. Módszerfejlesztés a fordított fázisú kromatográfiában .....	42
1.3.1. A log $D$ meghatározása .....	42
1.3.2. Modell alapú kísérlettervezés .....	45
1.3.2.1. A DryLab szoftver .....	46
1.3.2.1.1. A $t_G$ - $T$ -pH 3D modell.....	49
1.3.2.1.2. A $t_G$ - $T$ - $t_c$ 3D modell.....	50
1.3.2.1.3. A szimulált robusztusság vizsgálata.....	51
1.3.2.2. A mérés tervezése .....	52
1.3.2.3. Quality by Design a gyógyszer-analitikában.....	56
1.4. Szuperkritikus és szubkritikus fluid kromatográfia .....	60
1.5. Irodalom .....	65
2. Termikus analízis .....	69
2.1. Bevezetés.....	69
2.2. A termoanalitikai mérőberendezések felépítése .....	71
2.3. Termogravimetria .....	73
2.4. Differenciális pásztázó kalorimetria (DSC) .....	75
2.4.1. A DTA és DSC működési elve.....	76
2.4.2. Hőáram-DSC és teljesítménykompenzációs DSC.....	78
2.4.3. Polimorfia vizsgálata .....	81
2.4.3.1 Polimorf módosulatok mennyiségi mérése .....	87

2.4.4.	Fázisdiagramok felvétele DSC-mérések alapján. A termikus analízis alkalmazása királis vegyületek elválasztásának tervezésében .....	90
2.4.5.	Amorf anyagok vizsgálata. Modulált hőmérsékletű differenciális pásztázó kalorimetria (MTDSC).....	96
2.5.	Szimultán és kapcsolt módszerek. Fejlődőgáz-elemzés (EGA).....	101
2.5.1.	Szimultán TA-módszerek megvalósítása, előnyei.....	101
2.5.2.	Fejlődőgáz-elemzés (EGA) speciális detektorokkal.....	102
2.5.3.	Kapcsolt EGA-módszerek: TG-EGA-MS, TG-EGA-FTIR ...	104
2.5.3.1.	Kristályhidrátok, -szolvátok és oldószerzárványok jellemzése.....	107
2.5.3.2.	Bomlási folyamatok leírása .....	111
2.5.3.3.	Szupramolekuláris vegyületek, kokristályok vizsgálata.....	116
2.7.	Irodalom .....	118
3.	Pásztázó túspondás módszerek .....	121
3.1.	Bevezetés.....	121
3.2.	A pásztázó túspondás mikroszkóp működési elve .....	123
3.3.	Pásztázó alagútmikroszkóp .....	131
3.3.1.	Vákuum alatt működtetett mikroszkópok.....	134
3.3.2.	Pásztázó túspondás spektroszkópia .....	136
3.4.	Atomi erőmikroszkóp .....	137
3.4.1.	A megfelelő AFM-tű kiválasztása.....	139
3.5.	A pásztázó túspondás mikroszkópok bővülő családja .....	139
3.6.	SPM-felvételek kvantitatív kiértékelése.....	141
3.7.	Irodalom .....	144
4.	Tömegspektrometria .....	145
4.1.	Bevezetés.....	145
4.2.	A tömegspektrometria alapfogalmai, legfontosabb módszerei.....	148
4.2.1.	Alapfogalmak, legfontosabb jellemzők .....	148
4.2.2.	Ionizációs módszerek .....	152
4.2.3.	Tömeganalizátorok .....	157
4.2.4.	Tandem tömegspektrometria (MS/MS) .....	159
4.2.5.	Kapcsolt technikák .....	161
4.3.	A tömegspektrometria szerepe a gyógyszerkutatásban .....	164
4.3.1.	Hatóanyagok, segédanyagok, gyógyszerterológiai késztermékek vizsgálata. Szennyezők/szennyezésprofil, stabilitás (bomlástermékek), kompatibilitás vizsgálatok .....	165
4.3.2.	Metabolitkutatás .....	166
4.3.3.	Kvantitatív mérések (farmakokinetika), validálás.....	167
4.4.	Makromolekulák vizsgálata (fehérjék, fehérjealapú gyógyszerek)..	168

4.5. Irodalom .....	170
5. Egykristály-röntgendiffrakció .....	171
5.1. Bevezetés .....	171
5.2. Röntgendiffrakciós vizsgálatok .....	173
5.3. Szerves kristályok polimorfája .....	183
5.3.1. Történeti áttekintés .....	183
5.3.2. A polimorfia gyakori és ritka formái .....	184
5.3.3. Konformációs polimorfia .....	185
5.3.4. Síkmolekulák polimorfája .....	187
5.3.5. Szupramolekuláris hatások molekulakonformációkra .....	187
5.3.6. Eltűnő, majd visszatérő polimorfia .....	188
5.4. Szerves kristályok izostrukturálitása .....	190
5.4.1. Kristályizomorfia .....	190
5.4.2. Az izostrukturálitás jellemzői .....	191
5.4.3. Az izostrukturálitás számítása .....	192
5.4.3.1. Az elemi cella hasonlósági indexe .....	192
5.4.3.2. A molekulák pozíciójának összehasonlítása az elemi cellában .....	192
5.4.3.3. Az izostrukturálitás térfogati indexe .....	193
5.4.4. Az izostrukturálitást építő és gátló tényezők .....	193
5.4.4.1. A molekulák mérete .....	193
5.4.4.2. Kooperatív szubsztituensek .....	194
5.4.4.3. A szénatom kiralitásváltozásának hatása .....	196
5.4.4.4. Morfotrópia okozta korlátok .....	197
5.4.4.5. A spontán rezolválódás hatása .....	199
5.4.6. Az izostrukturálitás tervezése .....	200
5.4.7. Molekulatársulások, zárványkomplexek izostrukturálitása .....	203
5.4.8. Izostrukturálitást mutató polimorfok .....	203
5.4.8.1. Polimorfok izostrukturálitása két dimenzióban .....	203
5.4.8.2. Polimorfia azonos elemi cellával .....	205
5.4.8.3. Polimorf izostrukturálitás három dimenzióban .....	206
5.4.8.4. Valós molekulaelfordulások polimorfokban .....	207
5.5. Nem-krisztallográfiai elfordulások rokon vegyületek között .....	209
5.5.1. Virtuális molekulaelfordulások .....	209
5.5.2. Morfotrópia: az izostrukturálitást gátló tényező .....	209
5.5.4. Kalixarének morfotrópiája .....	214
5.6. Irodalom .....	218
6. Atomabszorpciós spektrometria .....	223
6.1. A szabad atomok fényelnyelése, az AAS alapösszefüggései .....	224
6.2. Az atomi vonalak szélessége .....	225
6.3. Atomabszorpciós spektrofotométerek .....	226

6.4. Lángnélküli, elektrotermikus atomizálás .....	229
6.5. Zavaró hatások (interferenciák).....	231
6.6. AAS-meghatározások, kiértékelési módszerek .....	233
6.6.1. Hidridgenerálás (HG-AAS).....	234
6.6.2. Hideggőz (CV = cold vapor)-eljárás.....	235
6.7. Nagy felbontású folytonos fényforrással működő AAS (HR-CS AAS).....	235
6.8. Gyógyszer-analitikai alkalmazások.....	236
6.9. Irodalom .....	237
7. Ultraibolya-látható (UV-VIS) spektroszkópia .....	239
7.1. Bevezetés.....	239
7.2. A molekulaszpektroszkópia módszerei .....	240
7.2.1. Az UV-VIS tartomány felosztása.....	241
7.2.2. Elektronátmenetek az UV-VIS tartományban .....	242
7.3. A módszer alkalmazása a mennyiségi analitikában. Lambert–Beer- törvény .....	245
7.3.1. A Lambert–Beer-törvény korlátai. Mérési hibák .....	248
7.4. Az UV-készülékek felépítése, a mérés elvégzése.....	251
7.4.1. A készülékek kalibrálása.....	255
7.4.2. Az abszorbanciamérés pontosságának és a szórt fény ellenőrzése.....	257
7.4.3. A mérések validálása .....	260
7.4.3.1. Specifikusság.....	260
7.4.3.2. Linearitás .....	260
7.4.3.3. Pontosság (torzítatlanság).....	261
7.4.3.4. Ismételhetőség .....	261
7.4.3.5. Reprodukálhatóság .....	261
7.4.3.6. Robusztusság.....	262
7.4.3.7. Hatóanyag-tartalom számítása a validálásnál.....	262
7.5. Irodalom .....	262
8. Rezgési spektroszkópia.....	263
8.1. Bevezetés és alapfogalmak.....	263
8.2. A rezgési szintek és átmenetek elméleti leírása és számítása.....	265
8.3. Szerkezeti információk az IR- és Raman-spektrumokban .....	271
8.3.1. Elsődleges szerkezeti információk: karakterisztikus kötési és csoportfrekvenciák .....	271
8.3.2. További szerkezeti információk.....	274
8.4. Műszerek és spektrumfelvételi technikák .....	278
8.4.1. IR-spektrométerek .....	278
8.4.2. IR-spektrumfelvételi technikák .....	282
8.4.3. Raman-spektrométerek .....	285

8.4.4. Raman-spektrumfelvételi technikák .....	288
8.5. Speciális módszerek .....	288
8.5.1. Csatolt technikák .....	289
8.5.2. FT-IR- és Raman-mikroszkópok és képalkotás .....	290
8.5.3. Térben elcsúsztatott Raman-spektroszkópia (SORS).....	293
8.5.4. Távoli IR- és terahertz-spektroszkópia, 3D terahertz- képalkotás .....	295
8.5.5. Rezgési optikai aktivitás: VCD és ROA.....	297
8.5.6. Nemlineáris Raman-módszerek.....	302
8.5.7. 2D korrelációs spektroszkópia.....	304
8.6. Irodalom .....	306
9. Közeli infravörös (NIR) spektroszkópia.....	307
9.1. Bevezetés.....	307
9.2. A NIR-módszerek alapjai .....	307
9.3. A NIR-spektroszkópia kvalitatív módszerei.....	313
9.3.1. Az alkalmazott kemometriai módszerek.....	314
9.3.2. A kvalitatív NIR-módszerek gyógyszeripari alkalmazásai.....	315
9.3.2.1. Anyagazonosítás, minősítés.....	315
9.3.2.2. Polimorfia .....	316
9.3.2.3. Egyéb kvalitatív célú alkalmazások, hamisítások, eredetvizsgálat.....	317
9.4. A NIR-spektroszkópia kvantitatív módszerei a gyógyszer vizsgálatokban .....	318
9.4.1. A kvantitatív elemzés regressziós módszerei.....	318
9.4.2. Kvantitatív NIR-módszerek gyógyszeripari alkalmazásai .....	319
9.5. A NIR-módszerek minőségvezérelt in-line és on-line módszerei, ill. alkalmazásai .....	321
9.6. NIR-képalkotó (imaging) módszerek .....	326
9.8. Irodalom .....	328
10. NMR-spektroszkópia .....	331
10.1. Az NMR-spektroszkópia alapjai .....	331
10.1.1. Fizikai alapfogalmak .....	331
10.1.2. A kémiai eltolódás .....	345
10.1.3. Spin–spin kölcsönhatás, spinrendszerek .....	348
10.1.4. Molekulaszimmetria az NMR-ben .....	356
10.1.5. <sup>1</sup> H NMR-spektrumok. A spektrumparaméterek és a kémiai szerkezet kapcsolata .....	357
10.1.5.1. A kémiai eltolódást meghatározó tényezők .....	357
10.1.5.1.1. Diamágneses hozzájárulás .....	357
10.1.5.1.2. Paramágneses hozzájárulás.....	358

10.1.5.1.3. Anizotróp hozzájárulás – szomszédcsoport-hatás .....	359
10.1.5.2. A H,H-csatolási állandók és a kémiai szerkezet közötti kapcsolatok .....	364
10.1.5.2.1. Geminális $^2J(\text{H,H})$ csatolások .....	365
10.1.5.2.2. Vicinális $^3J(\text{H,H})$ csatolások .....	365
10.1.5.2.3. Távolható (long-range) $^nJ(\text{H,H})$ csatolások ( $n \geq 4$ ) .....	370
10.1.6. $^{13}\text{C}$ NMR-spektrumok. Jellegzetes széneltolódások, s az ezeket meghatározó szerkezeti tulajdonságok .....	371
10.1.7. Kettősrezonancia .....	377
10.1.8. A nukleáris Overhauser-effektus (NOE).....	380
10.1.9. A molekuláris mozgások, a molekuladinamika hatása a spektrumokra – cserefolyamatok. DNMR- és VTNMR- spektroszkópia.....	381
10.2. Az NMR-spektroszkópia gyakorlata .....	385
10.2.1. Minta-előkészítés.....	385
10.2.2. Az NMR-spektrométer felépítése és működése .....	386
10.3. Az alapspektrumokat kiegészítő legfontosabb NMR-mérési módszerek.....	391
10.3.1. A $^{13}\text{C}$ -vonalak csoportosítása a szénatomok rendüisége szerint .....	391
10.3.2. Szelektív, egydimenziós NMR-technikák .....	392
10.3.2.1. Szelektív 1D TOCSY-mérés .....	392
10.3.2.2. Szelektív 1D NOESY- és DNOE (DIFFNOE)- mérés .....	393
10.3.3. Kétdimenziós (2D) NMR-mérések.....	395
10.3.3.1. 2D COSY-spektrum .....	396
10.3.3.2. 2D TOCSY-spektrum.....	397
10.3.3.3. 2D HSQC-spektrum .....	398
10.3.3.4. 2D HMBC-spektrum .....	399
10.3.3.5. 2D NOESY-spektrum .....	401
10.3.4. Az NMR-szerkezetfelderítés stratégiái.....	403
10.4. Az NMR-spektroszkópia egyéb alkalmazásai a gyógyszerkutatóban.....	404
10.4.1. Elegyanalízis kvantitatív NMR-rel (qNMR).....	404
10.4.2. Ligandum-receptor kötődés vizsgálatok NMR- spektroszkópiával.....	406
10.4.3. Elválasztástechnikával kapcsolt NMR .....	407
10.5. Irodalom .....	409
Tárgymutató.....	411



## Rövidítésjegyzék

1D, 2D, 3D, MD 4k	egy-, két-, három-, több- (multi) dimenziós kompozíció, konstitúció, konfiguráció és konformáció
AAS	atomabszorpciós spektrometria ( <u>a</u> tomic <u>a</u> bsorption <u>s</u> pectrometry)
ADME	felszívódás, eloszlás, metabolizmus és kiürülés ( <u>a</u> bsorption, <u>d</u> istribution, <u>m</u> etabolism and <u>e</u> xcretion)
ADME-Tox	<u>ADME</u> + toxicitás ( <u>t</u> oxicity)
AFM	atomi erőmikroszkóp ( <u>a</u> tomic <u>f</u> orce <u>m</u> icroscope)
ANN	mesterséges neurális hálózat ( <u>a</u> rtificial <u>n</u> eural <u>n</u> etwork)
AOTF	akusztó-optikusan hangolt szűrő ( <u>a</u> cousto- <u>o</u> ptical <u>t</u> unable <u>f</u> ilter)
APCI	légköri nyomású kémiai ionizáció ( <u>a</u> tmospheric <u>p</u> ressure <u>C</u> I)
API	hatóanyag ( <u>a</u> ctive <u>p</u> harmaceutical <u>i</u> ngredient)
APPI	légköri nyomású fotoionizáció ( <u>a</u> tmospheric <u>p</u> ressure <u>p</u> hoto <u>i</u> onization)
APT	<u>a</u> tached <u>p</u> roton <u>t</u> est
ASIS	aromás oldószer által indukált eltolódás ( <u>a</u> romatic <u>s</u> olvent- <u>i</u> nduced <u>s</u> hift)
ATR	csillapított teljes reflexió ( <u>a</u> ttenuated <u>t</u> otal <u>r</u> eflection)
B3LYP	<u>B</u> ecke 3-parameter (exchange), <u>L</u> ee, <u>Y</u> ang and <u>P</u> arr (functional)
CARS	koherens anti-Stokes Raman-szórás ( <u>c</u> oherent <u>a</u> nti- <u>S</u> tokes <u>R</u> aman <u>s</u> cattering)
CAT	spektrumakkumuláció ( <u>c</u> omputer <u>a</u> veraged <u>t</u> ransients)
CC	<u>c</u> oupled <u>c</u> luster
CCD	töltéscsatolt eszköz ( <u>c</u> harge <u>c</u> oupled <u>d</u> evice)
CCDC	<u>C</u> ambridge <u>C</u> rystallographic <u>D</u> ata <u>C</u> entre
CD	cirkuláris dikroizmus ( <u>c</u> ircular <u>d</u> ichroism)
CE	kapilláris elektroforézis ( <u>c</u> apillary <u>e</u> lectrophoresis)
CI	hasonlósági index ( <u>c</u> onformity <u>i</u> ndex)
CI	kémiai ionizáció ( <u>c</u> hemical <u>i</u> onization)

CID	ütköztetés által kiváltott disszociáció ( <u>c</u> ollision- <u>i</u> nduced <u>d</u> issociation)
CNLSD	condensation nucleation light-scattering detector
COSY	<u>c</u> orrelation <u>s</u> pectroscopy
CRTA	szabályozott sebességű termikus analízis ( <u>c</u> ontrolled <u>r</u> ate <u>t</u> hermal <u>a</u> nalysis)
CrystMet	<u>M</u> etals and <u>A</u> lloys <u>C</u> rystallographic Database
CV	hideggőz-eljárás ( <u>c</u> old <u>v</u> apor technique)
CVU	<u>c</u> alibration <u>v</u> alidation <u>u</u> nit
CW	folytonos gerjesztésű ( <u>c</u> ontinuous <u>w</u> ave) mérés
CZE	kapilláris zónaelektroforézis ( <u>c</u> apillary <u>z</u> one <u>e</u> lectrophoresis)
CSD	<u>C</u> ambridge <u>S</u> tructural <u>D</u> atabase
D2OD	optikai sűrűség 2. deriváltja (2 <sup>nd</sup> <u>d</u> erivative of <u>o</u> ptical <u>d</u> ensity)
DA	diódasor ( <u>d</u> iode <u>a</u> rray)
DA	diszkriminanciaanalízis ( <u>d</u> iscriminating <u>a</u> nalysis)
DART	valós idejű direkt analízis ( <u>d</u> irect <u>a</u> nalysis in <u>r</u> eal <u>t</u> ime)
DCP-ROA	<u>d</u> ual <u>c</u> ircular <u>p</u> olarization <u>R</u> aman <u>o</u> ptical <u>a</u> ctivity
DEPT	<u>d</u> istortionless <u>e</u> nhancement of <u>p</u> olarisation <u>t</u> ransfer
DESI	<u>d</u> esorption <u>e</u> lectrospray <u>i</u> onization
DF	<u>d</u> iffuse <u>r</u> eflection
DFT	sűrűségfüggvény-elmélet ( <u>d</u> ensity <u>f</u> unctional <u>t</u> heory)
DMA	dinamikus termomechanikai analízis ( <u>d</u> ynamic <u>t</u> hermo <u>m</u> echanical <u>a</u> nalysis)
DMF	dimetilformamid
DMSO	dimetilszulfoxid
DNMR	dinamikus NMR
DNOE/DIFFNOE	differencia NOE
DoE	kísérletek tervezése ( <u>d</u> esign of <u>e</u> xperiments)
DR	kettősrezonancia ( <u>d</u> ouble <u>r</u> esonance)
DRIFTS	<u>d</u> iffuse <u>r</u> eflectance <u>i</u> nfrared <u>F</u> ourier <u>t</u> ransform <u>s</u> pectroscopy
DS	a mérés tere ( <u>d</u> esign <u>s</u> pace)
DSC	differenciális pásztázó kalorimetria ( <u>d</u> ifferential <u>s</u> canning <u>c</u> alorimetry)
DSS	nátrium-( <u>d</u> imetil-2- <u>s</u> zilapentán-5- <u>s</u> zulfonát)

DTA	differenciális termikus analízis ( <u>d</u> ifferential <u>t</u> hermal <u>a</u> nalysis)
DTG	derivatív termogravimetria ( <u>d</u> erivative <u>t</u> hermogravimetry)
DVS	dinamikus gőzszorpció ( <u>d</u> ynamic <u>v</u> apor <u>s</u> orption)
ECD	<u>e</u> lectronic <u>c</u> ircular <u>d</u> ichroism
EDL	elektrodnélküli kisülési lámpa ( <u>e</u> lectrodeless <u>d</u> ischarge <u>l</u> amp)
EFM	elektrosztatikus erőmikroszkóp ( <u>e</u> lectrostatic <u>f</u> orce <u>m</u> icroscope)
EGA	fejlődőgáz-analízis ( <u>e</u> volved <u>g</u> as <u>a</u> nalysis)
EGD	fejlődőgáz-detektálás ( <u>e</u> volved <u>g</u> as <u>d</u> etection)
EI	elektronütközéses ionizáció ( <u>e</u> lectron <u>i</u> onization)
EMS	elektromágneses sugárzás
ESI	elektroporlasztásos ionizáció ( <u>e</u> lectrospray <u>i</u> onization)
ETAAS	elektrotermikus atomabszorpciós spektrometria ( <u>e</u> lectro <u>t</u> hermal <u>A</u> AS)
FAAS	láng-atomabszorpciós spektrometria ( <u>f</u> lame <u>A</u> AS)
FDA	Amerikai Élelmiszer- és Gyógyszer-ellenőrzési Hatóság ( <u>F</u> ood and <u>D</u> rug <u>A</u> Administration)
FID	szabad indukciós jel ( <u>f</u> ree <u>i</u> nduction <u>d</u> ecay)
FID	lángionizációs detektor ( <u>f</u> lame <u>i</u> onization <u>d</u> etector)
FIR	távoli infravörös ( <u>f</u> ar- <u>i</u> nfrared)
FMM	erőmodulációs mikroszkóp ( <u>f</u> orce modulation microscope)
FPA	fókuszsík-tömb ( <u>f</u> ocal <u>p</u> lane <u>a</u> rray) detektor
FT	<u>F</u> ourier- <u>t</u> ranszformáció(s)
FTIR	<u>F</u> ourier- <u>t</u> ranszformációs infravörös spektroszkópia ( <u>F</u> T <u>i</u> nfrared spectroscopy)
GC	gázkromatográfia ( <u>g</u> as <u>c</u> hromatography)
GC-MS	gázkromatográfiával kapcsolt tömegspektrometria
GFAAS	grafitkemencés atomabszorpciós spektrometria ( <u>g</u> raphite <u>f</u> urnace <u>A</u> AS)
GLP	helyes laboratóriumi gyakorlat ( <u>g</u> ood <u>l</u> aboratory <u>p</u> ractice)
HG-AAS	hidridképzéses atomabszorpciós spektrometria ( <u>h</u> ydride <u>g</u> eneration <u>A</u> AS)
HMBC	<u>h</u> eteronuclear <u>m</u> ultiple <u>b</u> ond <u>c</u> oherence

HPLC	nagyhatékonyságú folyadékkromatográfia ( <u>h</u> igh <u>p</u> erformance <u>l</u> iquid <u>c</u> hromatography)
HPLC-MS	nagyhatékonyságú folyadékkromatográfiával kapcsolt tömegspektrometria
HR-CS AAS	nagyfelbontású folytonos fényforrással működő atomabszorpciós spektrometria ( <u>h</u> igh <u>r</u> esolution – <u>c</u> ontinuous <u>s</u> ource <u>A</u> AS)
HSC	<u>h</u> eteronuclear <u>s</u> hift <u>c</u> orrelation
HSQC	<u>h</u> eteronuclear <u>s</u> ingle quantum <u>c</u> oherence
HTLC	emelt hőmérsékletű folyadékkromatográfia ( <u>h</u> igh <u>t</u> emperature <u>l</u> iquid <u>c</u> hromatography)
HTS	<u>h</u> igh <u>t</u> hroughput <u>s</u> creening
ICH	gyógyszerügyi hatóságok harmonizációs (dokumentumai) ( <u>I</u> nternational <u>C</u> onference on <u>H</u> armonisation)
ICP-MS	induktív csatolású plazma tömegspektrometria ( <u>i</u> nductively <u>c</u> oupled <u>p</u> lasma <u>M</u> S)
ICP-ROA	<u>i</u> ncident <u>c</u> ircular <u>p</u> olarization <u>R</u> aman <u>o</u> ptical <u>a</u> ctivity
ILOE	<u>i</u> nter-ligand <u>N</u> OE
IR	infravörös ( <u>i</u> nfrared)
IRRAS	<u>i</u> nfrared <u>r</u> eflection <u>a</u> bsorption <u>s</u> pectroscopy
IT	ioncsapda ( <u>i</u> on <u>t</u> rap)
LAESI	<u>l</u> aser <u>a</u> blation <u>e</u> lectrospray <u>i</u> onization
LC	folyadékkromatográfia ( <u>l</u> iquid <u>c</u> hromatography)
LCTF	hangolható folyadékkristály szűrő ( <u>l</u> iquid <u>c</u> ystal <u>t</u> unable <u>f</u> ilter)
LED	fénykibocsátó dióda ( <u>l</u> ight <u>e</u> mitting <u>d</u> iode)
LEED	kisenergiájú elektrondiffrakció ( <u>l</u> ow- <u>e</u> nergy <u>e</u> lectron <u>d</u> iffraction)
MAB	monoklonális antitest ( <u>m</u> onoclonal <u>a</u> nti <u>b</u> ody)
MALDI	mátrixszal segített lézerdeszorpciós ionizáció ( <u>m</u> atrix- <u>a</u> ssisted <u>l</u> aser <u>d</u> esorption <u>i</u> onization)
MCT	<u>m</u> ercury- <u>c</u> admium- <u>t</u> elluride (detektor)
MEKC	micelláris elektrokinetikus kromatográfia ( <u>m</u> icellar <u>e</u> lectro <u>k</u> inetic <u>c</u> hromatography)
MFM	mágneses erőmikroszkóp ( <u>m</u> agnetic <u>f</u> orce <u>m</u> icroscope)
MIR	közép infravörös ( <u>m</u> id- <u>i</u> nfrared)

MLR	többszörös lineáris regresszió ( <u>m</u> ultiple <u>l</u> inear <u>r</u> egression)
MRM	fragmentációs folyamatok monitorozása ( <u>m</u> ultiple <u>r</u> eaction <u>m</u> onitoring)
MS	tömegspektrometria ( <u>m</u> ass <u>s</u> pectrometry)
MS/MS	tandem tömegspektrometria (tandem mass spectrometry)
MSC	többszörös szóródási korrekció ( <u>m</u> ultiplicative <u>s</u> catter <u>c</u> orrection)
MTDSC	modulált hőmérsékletű DSC ( <u>m</u> odulated temperature <u>D</u> SC)
MW	molekulatömeg ( <u>m</u> olecular <u>w</u> eight)
NADB	Nukleinsav Adatbank ( <u>N</u> ucleic <u>A</u> cid <u>D</u> atabase)
Nd:YAG	<u>n</u> eodymium-doped <u>y</u> ttrium <u>a</u> luminium garnet
NIR	közeli infravörös ( <u>n</u> ear- <u>i</u> nfrared)
NMR	mágneses magrezonancia ( <u>n</u> uclear <u>m</u> agnetic resonance)
nOe, NOE/NOESY	<u>n</u> uclear <u>O</u> verhauser effect / spectroscopy
NQAD™	<u>N</u> ano <u>Q</u> uant <u>A</u> nalyste <u>D</u> etector
OD	optikai sűrűség ( <u>o</u> ptical <u>d</u> ensity)
ORD	optikai rotációs diszperzió ( <u>o</u> ptical <u>r</u> otatory <u>d</u> ispersion)
PAT	folyamatfelügyelő, -analizáló technológia (process <u>a</u> nalystical <u>t</u> echnology)
PB	propán-bután
PCA	főkomponens-analízis ( <u>p</u> rincipal <u>c</u> omponent <u>a</u> nalysis)
PCR	főkomponens-regresszió ( <u>p</u> rincipal <u>c</u> omponent <u>r</u> egression)
PDB	Protein Adatbank ( <u>P</u> rotein <u>D</u> ata <u>B</u> ank)
PDM	fázisdetektálási mikroszkóp ( <u>p</u> hase <u>d</u> etection <u>m</u> icroscope)
Ph. Eur.	Európai Gyógyszerkönyv ( <u>E</u> uropean <u>P</u> harmacopoeia)
PLS	részleges legkisebb négyzetek ( <u>p</u> artial <u>l</u> east <u>s</u> quares)
PMT	fénysokszorozó cső ( <u>p</u> hotom <u>m</u> ultiplier <u>t</u> ube)
ppm	milliomod rész ( <u>p</u> arts <u>p</u> er <u>m</u> illion)
PTM	poszttranszlációs módosulás ( <u>p</u> ost- <u>t</u> ranslational <u>m</u> odification)

Py-GC-MS	pirolízis gázkromatográfia – tömegspektrometria (pyrolysis <u>GC-MS</u> )
Q	kvadrupól (quadrupole); pl. analizátor
QbD	tervezett minőség (quality by design)
QMS	kvadrupól tömegspektrométer (quadrupole <u>mass spectrometer</u> )
qNMR	kvantitatív (quantitative) <u>NMR</u>
QQQ	hármás kvadrupól (triple quadrupole)
RAIRS	<u>r</u> eflection <u>a</u> bsorption <u>i</u> nfrared <u>s</u> pectroscopy
RAS	<u>r</u> eflection <u>a</u> bsorption <u>s</u> pectroscopy
RF	<u>r</u> ádió <u>f</u> rekvencia, - <u>f</u> rekvenciás
ROA	<u>R</u> aman <u>o</u> ptical <u>a</u> ctivity
RP	fordított fázisú ( <u>r</u> eversed <u>p</u> hase)
RPD	maradék predikciós eltérés ( <u>r</u> esidual <u>p</u> redictive <u>d</u> eviation)
RPLC	fordított fázisú folyadékkromatográfia ( <u>r</u> eversed <u>p</u> hase <u>L</u> C)
S/N	jel/zaj viszony ( <u>s</u> ignal-to- <u>n</u> oise)
SCM	pásztázó kapacitásmikroszkóp ( <u>s</u> canning <u>c</u> apacitance <u>m</u> icroscope) vagy szórkapacitás- mikroszkóp ( <u>s</u> preading <u>c</u> apacitance <u>m</u> icroscope)
SCP-ROA	<u>s</u> cattered <u>c</u> ircular <u>p</u> olarization <u>R</u> aman <u>o</u> ptical <u>a</u> ctivity
SEC	kalibráció standard hibája ( <u>s</u> tandard <u>e</u> rror of <u>c</u> alibration)
SECV	keresztvalidálás standard hibája ( <u>s</u> tandard <u>e</u> rror of <u>c</u> ross- <u>v</u> alidation)
SEP	predikció standard hibája ( <u>s</u> tandard <u>e</u> rror of <u>p</u> rediction)
SERS	<u>s</u> urface- <u>e</u> nhanced <u>R</u> aman <u>s</u> cattering
SFC	szuperkritikus fázisú kromatográfia ( <u>s</u> upercritical <u>f</u> luid <u>c</u> hromatography)
SIMCA	osztályanalógiák közvetett modellezése ( <u>s</u> oft <u>i</u> ndependent <u>m</u> odelling of <u>c</u> lass <u>a</u> nalogy)
SKM	pásztázó Kelvin-szonda mikroszkóp ( <u>s</u> canning <u>K</u> elvin- <u>p</u> robe <u>m</u> icroscope)
SNOM	pásztázó optikai közeltér-mikroszkóp ( <u>s</u> canning <u>n</u> ear- <u>f</u> ield <u>o</u> ptical <u>m</u> icroscope)
SNV	standard normál variancia ( <u>s</u> tandard <u>n</u> ormal <u>v</u> ariate)

SORS	spatially offset Raman spectroscopy
SPE	szilárd fázisú extrakció (solid phase extraction)
SPM	pásztázó tűszondás mikroszkóp (scanning probe microscope)
SQM	scaled quantum mechanical
SR	sift-reagens (shift reagent)
SR	spekuláris reflexió
SRS	stimulated Raman scattering
STD	telítés-átvitel-differencia (saturation transfer difference)
SThM	pásztázó termikus mikroszkóp (scanning thermal microscope)
STM	pásztázó alagútmikroszkóp (scanning tunneling microscope)
STS	pásztázó tűszondás spektroszkópia (scanning tunneling spectroscopy)
SVM	támogató vektor módszer (support vector machines)
TA	termikus analízis (thermal analysis)
TG, TGA	termogravimetria (thermogravimetry, thermogravimetric analysis)
TIC	„totálion” kromatogram (total ion chromatogram)
TINS	target immobilized NMR screening
TLC	vékonyréteg-kromatográfia (thin-layer chromatography)
TMA	termomechanikai analízis (thermomechanical analysis)
TMS	tetrametilszilán
TOCSY	total correlation spectroscopy
TOF	repülési idő (time of flight)
TPI	terahertz pulsed imaging
TPS	terahertz pulsed spectroscopy
UHPLC	ultranagy-hatékonyságú/-nyomású folyadékkromatográfia (ultra HPLC)
UHPSFC	ultranagy-hatékonyságú szuperkritikus fázisú kromatográfia (ultra high performance SFC)
UV	ultraibolya (ultraviolet)
UV/DAD	UV-diódasoros detektor (UV diode array detector)
UV-VIS	ultraibolya-látható (ultraviolet-visible)

VCD	<u>v</u> ibrational <u>c</u> ircular <u>d</u> ichroism
VIS	látható ( <u>v</u> isible)
VOA	<u>v</u> ibrational <u>o</u> ptical <u>a</u> ctivity
VT NMR	változó hőmérsékletű ( <u>v</u> ariable <u>t</u> emperature) <u>NMR</u>
WEFT	vízjelelnyomás FT ( <u>w</u> ater <u>e</u> liminated <u>F</u> ourier transform)
XRD	röntgendiffrakció ( <u>X</u> -ray <u>d</u> iffraction)



# 1. Folyadékkromatográfia

*Fekete Jenő, Kormány Róbert, Fekete Szabolcs*

## 1.1. A folyadékkromatográfia alapjai

2003-ban ünnepeltük a modern kromatográfia egy évszázados évfordulóját. 1903-ban végezte Cvet orosz biológus híres kísérletét, amikor egy üvegcsőbe két vattadugó közé apró darabokra tört kalcium-karbonátot tett, és erre az oszlopra növényi levelek petroléteres kivonatát öntötte, melyet a továbbiakban tiszta petroléterrel mosott. Az addigi zöld szín összetevőire vált szét az oszlopon, ahol színes körkörös gyűrűként jelentek meg. Innen származik az elnevezés a *chromos*, mint „szín”, és *graphia*, mint „írás” szavakból. Cvet kísérleténél a mozgófázis folyadék, ezért az elnevezése folyadékkromatográfia. A mozgófázis halmazállapota szolgál a csoportosítás alapjául: ha az gáz, akkor gázkromatográfiáról, ha pedig szuperkritikus fluidum, akkor szuperkritikus fluid kromatográfiáról beszélünk.

Minden kromatográfias technika lineáris elúciós módszernek tekinthető, melynek főbb jellemzői: a mozgófázis állandóan áramlik az állófázis felett; a mintát impulzusszerűen adagoljuk a kromatográfias állófázisra (kolonnára); a mozgófázis szorpciója kisebb az állófázison, mint a leggyengébben kötődő komponensé; továbbá az adszorpciós izoterma lineáris szakaszán dolgozunk. Ekkor a kolonnára adagolt minta mennyiségétől és térfogatától a visszatartás és a csúcshélesedés független lesz. Mivel a különböző szerkezetű molekulák eltérő erősségű kölcsönhatást alakítanak ki az állófázissal, ezért a vándorlási sebességük eltér, amit a különböző retenciók (visszatartási) idejünkben észlelünk.

Egy anyag kromatográfias vizsgálatának általános feltétele, hogy azt a mozgófázis állapotába tudjuk vinni, szerkezeti átalakulás nélkül, a detektálási mód által megszabott koncentrációban. Ez folyadék-kromatográfias módszernél annyit jelent, hogy a vegyületeket kb.  $\mu\text{g}/\text{cm}^3$ -es koncentrációban fel tudjuk oldani a mozgófázisban. Mivel sokféle oldószer és oldószerkelet jöhet szóba, ezért a folyadékkromatográfia alkalmazási területe is igen széles, amely kiterjed a kis szerves ionoktól a több milliós molekulatömegű fehérjékig. Napjainkra a folyadékkromatográfia számos területen nélkülözhetetlen analitikai módszerré vált. Ez különösen igaz a gyógyszeripar minden területére,

úgy mint az új gyógyszermolekulák kutatására, a belőlük nyert termékek előállítására, illetve minőségbiztosítására.

A folyadékromatográfia hosszú ideig Csipkerózsika álmát aludta, csak az 1970-es évek közepére alakult ki a műszerezettsége. Ekkora már megjelentek a 10  $\mu\text{m}$  szemcseátmérőjű töltetek, a szabálytalan alakú szilikagél helyét fokozatosan átvették a szabályos, gömbszimmetrikus töltetek. A kolonnák geometriai méretüket tekintve 150-250 mm hosszúak és 4,6 mm belső átmérőjűek voltak. A műszerezettséget is ezekhez igazították, ennek megfelelően az adagolási térfogat 10-100  $\mu\text{l}$  közé esett, az UV-, UV-VIS detektorok cellatérfogatót 10  $\mu\text{l}$ -re, az összekötő vezetékek belső átmérőjét pedig 0,25 mm-re választották. Az így kialakított készülék alapjaiban teljes mértékben megfelelt a követelményeknek.

Hosszú ideig csak a számítógépes vezérlés és adatgyűjtés jelentette a fejlesztést. Ez a rendszer a gyógyszeripar fő analitikai módszerévé vált, és a technikát nagyhatékonyságú folyadékromatográfiának nevezték el (HPLC, High Performance Liquid Chromatography). A kolonnatöltetek döntő többségét a szilikagél alapúak képviselték, melyek nemcsak nagy fémiontartalommal rendelkeztek, de a nagy szilanolcsoport-aktivitásuk és a kis felületi borítottságuk miatt számos feladat megoldásánál nehezen reprodukálhatóvá tették a módszereket. Sokszor sarzsról-sarzsra változott a kolonnák felületi fizikai kémiája, és ez megmutatkozott az elválasztásokban is. Ebben az időben a fő feladatot a kolonnatechnológia fejlesztése jelentette, ezen belül is a kisebb fémiontartalmú, kisebb szilanolcsoport-aktivitású, jól borított állófázisok, és a sarzsról-sarzsra való azonosság adták a legfontosabb célokat. A 90-es évek végére, a 2000-es évek elejére sikerült az említett célokat elérni, melyekkel egyidejűleg bevezetésre kerültek az 5  $\mu\text{m}$  alatti szemcseátmérőjű töltetek. Napjainkban HPLC-technika alatt az eddig leírtakat értjük, kiegészítve azzal, hogy a készülékekre jellemző maximális nyomásteljesítmény 400 bar lett. Ezt a műszerezettséget alkalmazva az elemzési idő általában 5-60 perc közé esik, az elválasztásokban tapasztalt csúcshélességek pedig viszonylag nagyok.

Ahhoz, hogy az analitika kiszolgálja a gyógyszerfejlesztést, az elemzési időt nagymértékben csökkenteni kellett. A megoldásra több út kínálkozott: az egyik a kolonna szemcseméretének csökkentése, a másik a hőmérséklet növelése, a harmadik pedig új, nagyobb permeabilitású kolonnák készítése. Ez a harmadik megoldás vezetett el egyrészt a monolit kolonnához, másrészt a héjszerű töltetek bevezetéséhez. A fejezet közepontjában ezek az új kolonnatechnológiák állnak, nevezetesen: a 2  $\mu\text{m}$  szemcseátmérő alatti teljesen porózus, illetve a 3  $\mu\text{m}$  szemcseátmérő alatti

héjszerű töltetek, továbbá a monolitok, mindezek kiegészítve a gyors folyadékkromatográfia nagyhőmérsékletű ágával.

Az új kolonnatechnológiával és műszerezettséggel végrehajtott elválasztásokat, megkülönböztetve a hagyományos HPLC-technológiától, a továbbiakban ultranagy-hatékonyságú vagy ultranagynyomású folyadékkromatográfiának (Ultra High Performance/Pressure Liquid Chromatography, UHPLC) nevezzük összefoglaló néven. A fejezet tárgyalja a gyors folyadékkromatográfiával kapcsolatos elméleti megközelítéseket, és azok gyakorlatba való átültetését. Saját és irodalomból vett példákon keresztül bemutatjuk a legújabb fejlesztéseket, melyek az UHPLC-módszereken keresztül az elemzések idejét jelentősen lecsökkentették az elválasztási hatékonyság csökkenése nélkül. A gyógyszeranalitika területén ismét előtérbe került az elválasztási körülmények és a különböző paraméterek előrejelzése számítógépes alapon, amelyet a Quality by Design (QbD) elv fejez ki. Ennek az elvnek az alkalmazási lehetőségeit gyakorlati példákon keresztül mutatjuk be.

### 1.1.1. Alapfogalmak, alapösszefüggések

Ebben a rövid összefoglalóban azokat az alapfogalmakat és összefüggéseket adjuk meg, amelyeket a gyors folyadékkromatográfias ismertetésünkben felhasználunk. A tisztelt Olvasó ezekről bővebben az 1.5. pont alatt felsorolt ajánlott irodalomban tájékozódhat.

A folyadékkromatográfias elválasztás alapja az, hogy a különböző szerkezeti tulajdonsággal rendelkező komponensek eltérő kölcsönhatást alakítanak ki az állófázissal, amelyet mind a mozgófázis, mind a hőmérséklet befolyásol. Az eltérő kölcsönhatás miatt a komponensek vándorlási sebessége is eltérő lesz, amit a retenciós idők különbsége jelez. A kromatográfias elválasztás célja a hasonló fizikai kémiai szerkezetű vegyületek elkülönítése és mennyiségük meghatározása. Folyadékkromatográfiasan vizsgálhatók mindazon anyagok, amelyek átalakulás nélkül oldatba vihetők a detektálás megszabta koncentrációban. Az elválasztás alapegyenlete:

$$R_s = \frac{1}{4} \sqrt{N} \frac{\alpha - 1}{\alpha} \frac{k}{k + 1}, \quad (1.1)$$

ahol  $R_s$  a felbontás,  $N$  az elméleti tányérszám,  $\alpha$  a szelektivitási tényező és  $k$  a retenciós tényező. Az elválasztás alapegyenletében szereplő tényezők definíciója:

$$N = 16 \left( \frac{t_R}{w_b} \right)^2 = 5,54 \left( \frac{t_R}{w_{1/2}} \right)^2, \quad (1.2)$$

ahol  $t_R$  a retenció idő,  $w_b$  az alapvonalon mért csúcshélesség és  $w_{1/2}$  a csúcsmagasság felénél mért csúcshélesség;

$$k = \frac{t_R - t_0}{t_0}, \quad (1.3)$$

ahol  $t_0$  az inert anyag elúciós ideje (holtidő);

$$\alpha = \frac{k_2}{k_1}, \quad (1.4)$$

ahol  $k_2 > k_1$ .

Elúciós módszer alatt értjük azt, ha a minta bevitelére impulzuszerűen (dugószerűen) történik, a mozgófázis állandóan áramlik az állófázis felett, és szorpciója kisebb, mint a legkevésbé szorbeálódó mintakomponensé. Ezen belül lineáris elúciós módszerről akkor beszélünk, amikor a kolonnára adagolt minta mennyiségének függvényében az állófázis által adszorbeált anyagmennyiség arányosan változik.

Elméleti tányérmagasságnak ( $H$ ) nevezzük az ún. kromatográfiás tányérelmélet alapján azt a kolonnaszakaszt, melyben a mozgó- és az állófázis között az egyensúlyi koncentráció kialakul:

$$H = \frac{L}{N}, \quad (1.5)$$

ahol  $L$  a kolonna hossza.

A sebességi elmélet (*rate model*) a kolonnán létrejövő kromatográfiás zónaszélesítő hatások és a mozgófázis térfogatáramlási sebessége közötti összefüggéseket tárja fel, ennek alapfeltevései a következők:

1. A mozgó- és az állófázis között kvázi egyensúlyi helyzet van.
2. Az áramlási sebesség sugárirányú változása miatt örvénydiffúziós hatások érvényesülnek.
3. A kolonnán a hosszirányú diffúzió jelentősen növelheti a kromatográfiás csúcshélesedést.
4. Az anyagátadást mind az álló-, mind a mozgófázisban a diffúzió kontrollálja.

Mivel az egyes kromatográfiás csúcshélesítő hatások egymástól függetlenek, és ha a kromatográfiás csúcsok normális eloszlással közelíthetők, akkor a  $H$ -k összege adja meg a kolonna végén mérhető zónaszélesedést. Először van Deemter és kollégái mutatták meg, hogy

az elméleti tányérmagasság a lineáris sebesség ( $u$ ) függvényében egy minimumos görbével írható le:

$$H = A + \frac{B}{u} + Cu, \quad (1.6)$$

ahol  $A$  az örvénydiffúziós tag,  $B$  a hosszirányú diffúziós tag és  $C$  az anyagátadási ellenállásra jellemző tag. Az (1.6) alapegyenletet sokan továbbfejlesztették (Giddings, Knox, Golay, Hubert, Horváth, Myabe, Guiochon, Gritti és mások), különösen az  $A$  tag fizikai értelmezése az, amelyben az egyes megközelítések eltérnek.

Az örvénydiffúziós tag az eltérő áramlási csatornák következtében jelentkező kromatográfias csúcsszélesítő hatás. Elsősorban a töltet minőségétől (rendezettségétől), a szemcseátmérőtől, a komponens diffúziós állandójától és a mozgófázis sebességétől függ.

A hosszirányú diffúzió során a kolonnára adagolt zóna hosszirányban, az idő előrehaladtával, diffúziós úton szélesedik. A diffúzió okozta zónaszélesedés elsődlegesen a mozgófázisban történik, de nem elhanyagolható az állófázisban sem. Elsősorban a mozgófázis sebességétől, a komponens mozgó- és állófázisban mért diffúziós állandójától, a komponens obstrukciós (ütközési) tulajdonságaitól és visszatartásától függ. Minél nagyobb a komponens visszatartása, annál több idő áll rendelkezésre a hosszirányú diffúzió okozta zónaszélesítő hatásra.

Az anyagátadási ellenállás okozta kromatográfias zónaszélesedés azért alakul ki, mert a mozgó- és az állófázis között az egyensúly beállása nem pillanatszerű, így minden olyan tényező, amely növeli az egyensúly beállításának az idejét, kiszélesíti a kromatográfias csúcsot. Ilyen tényező lehet a póruson belüli álló és mozgó folyadék közötti diffúzió, illetve az álló- és mozgófázis közötti anyagátmenet kinetikus gátlása. A zónaszélesedés főleg a mozgófázis sebességétől, a komponens mozgó- és állófázisban mért diffúziós állandójától, visszatartásától, illetve a szemcseátmérőtől (állófázis morfológiájától) függ.

Ha szemléltetni akarjuk a szemcseátmérő ( $d_p$ ) és a diffúziós tulajdonságok (diffúziós állandó:  $D_M$ ) hatását az elválasztás hatékonyságára, akkor Neue szerint a következő egyszerűsített összefüggést írhatjuk fel:

$$H = A \cdot d_p + \frac{B \cdot D_M}{u} + C \frac{d_p^2 \cdot u}{D_M}. \quad (1.7)$$

Az optimális lineáris sebesség ( $u_{\text{opt}}$ ) a következők szerint írható le:

$$u_{\text{opt}} = \frac{\sqrt{D_M}}{d_p} \sqrt{\frac{B}{C}} \sim \frac{1}{d_p}. \quad (1.8)$$

Tehát a lineáris sebesség optimuma fordítva arányos a szemcseátmérővel. Az (1.8) egyenletet (1.7)-be helyettesítve megkapjuk a tányérmagasság minimumértékét ( $H_{\min}$ ):

$$H_{\min} = d_p (A + 2\sqrt{CB}) \sim d_p, \quad (1.9)$$

azaz az elérhető legkisebb tányérmagasság (legnagyobb tányérszám) egyenesen arányos a töltet szemcseátmérőjével.

Az additivitáselmélet következménye hagyományos HPLC-módszernél:

$$\Sigma H = H_A + H_B + H_{C,\dot{a}} + H_{C,m}, \quad (1.10)$$

ahol  $H_A$ ,  $H_B$ ,  $H_{C,\dot{a}}$  és  $H_{C,m}$  az  $A$  és  $B$  tagból, illetve az anyagátadási ellenállás álló- és mozgófázis-járulékból ( $C_{\dot{a}}$  és  $C_m$ ) adódó tányérmagasság-járulékok. UHPLC-módszernél az (1.10) egyenlethez járulnak még a hőgradiens ( $H_T$ ) és az ultranagy nyomás ( $H_P$ ) okozta zónaszélesítő hatások:

$$\Sigma H = H_A + H_B + H_{C,\dot{a}} + H_{C,m} + H_T + H_P. \quad (1.11)$$

A redukált paraméterek segítségével a különböző szemcseátmérőjű töltetek hatékonysága (minősége) hasonlítható össze, így például a redukált tányérmagasság ( $h$ ):

$$h = \frac{H}{d_p}, \quad (1.12)$$

és a redukált sebesség ( $v$ ):

$$v = \frac{ud_p}{D_M}. \quad (1.13)$$

A Knox-egyenlet a redukált paraméterekkel írja fel a tányéregyenletet, és figyelembe veszi az  $A$  tag sebességfüggését is:

$$h = Av^{1/3} + \frac{B}{v} + Cv. \quad (1.14)$$

Egy teljesen porózus szemcsékkel töltött kolonnát jónak ítélünk, ha teljesül, hogy  $2 < h_{\min} < 3$ , héjszerkezetű töltetknél pedig  $1,2 < h_{\min} < 2$  érték várható el.

A nyomásesést ( $\Delta p$ ) egy kolonnán a Darcy-törvénnyel írhatjuk le:

$$\Delta p = \frac{\phi \eta Lu}{d_p^2}, \quad (1.15)$$

ahol  $\phi$  a kolonna áramlási ellenállása és  $h$  a mozgófázis viszkozitása.

Az elválasztási ellenállás ( $E$ ) figyelembe veszi az elérhető tányérmagasságot és a kolonna áramlási ellenállását is, így a megvalósítható analízisidőről is adhat tájékoztatást:

$$E = \frac{t_r \Delta p}{N^2 \eta (1+k)} = \phi h^2. \quad (1.16)$$

A kinetikus elmélet segítségével az elválasztások időigényét (analízis idő, arányos a holtidővel) becsülhetjük adott nyomáson ( $\Delta p_{\max}$ ) és adott viszkozitású mozgófázissal, figyelembe véve a kolonna permeabilitását ( $K_V$ ) és az adott lineáris sebességnél mért tányérmagasságot; meghatározható továbbá, hogy egy adott tányérszámot milyen kolonnahosszal lehet elérni. Az elmélet alapegyenletei a következők:

$$t_0 = \left( \frac{\Delta p_{\max}}{\eta} \right) \left[ \frac{K_V}{u^2} \right], \quad (1.17)$$

$$N = \left( \frac{\Delta p_{\max}}{\eta} \right) \left[ \frac{K_V}{uH} \right]. \quad (1.18)$$

## 1.2. Fejlesztési irányok a folyadékkromatográfiában

A jelenlegi fejlesztések az elválasztások gyorsítására, illetve még hatékonyabbá tételére irányulnak, melyeknek nagy szerepe van a gyógyszerkészítmények minőség-ellenőrzésénél, de nem hanyagolhatók el az új gyógyszermolekulák megtalálásában sem. Általában mindenhol, ahol új módszer kidolgozására van szükség, a gyorsaság alapvető szempont, amit a kromatográfiában a kis retenciós idő jelent. A modern értelemben vett gyors folyadékkromatográfiának ez szükséges, de nem elégséges feltétele, mivel egyúttal az elválasztás hatékonysága sem változhat meg; utóbbi a kinetikai hatékonyság nagymértékű növelésével érhető el. A készülékgyártók folyamatosan csökkentik a készülékek oszlopon kívüli térfogatait, és egyre jobban kiterjesztik a lehetséges működtetési nyomástartományt. Jelenleg a kereskedelmi forgalomban kapható készülékek felső nyomáshatára 1200-1300 bar. Az oszlopgyártók egyre kisebb szemcseátmérőjű töltetes kolonnákkal, héjszerkezetű töltetekkel vagy új, karakterisztikus tulajdonságú monolitokkal állnak elő. A kolonna méretének csökkentése is szükséges a gyors elválasztásokhoz.

Először is nézzük meg, hogy milyen előnyöket adnak a nagy hatékonyságú és kis térfogatú kolonnák! A szakirodalom elsődlegesen a

kis szemcseátmérőt hangsúlyozza, holott a kis térfogat szorosan összefügg a gyorsasággal és a csúcsmaximumban mért koncentrációval is. A kisebb holtterfogat kisebb komponenshígulást jelent, amelynek eredménye a jobb kimutatási határ, vagy másképpen, a nagyobb érzékenység. A gyorsaság megítéléséhez a következő alapösszefüggésből kell kiindulnunk:

$$t_R = t_0(1 + k) . \quad (1.19)$$

A kifejezésben  $t_R$  a (bruttó) retenciós időt jelenti,  $t_0$  a holtidő,  $k$  a retenciós tényező;

$$t_0 = \frac{L}{u} , \quad (1.20)$$

ahol  $L$  a kolonnahossz és  $u$  a lineáris áramlási sebesség. (1.19)-et (1.20)-ba helyettesítve kapjuk:

$$t_R = \frac{(1 + k)L}{u} . \quad (1.21)$$

Az összefüggésből következik, hogy az elemzési idő csökkentésének két útja van: egyik a kolonnahossz nagymértékű csökkentése, másik a lineáris áramlási sebesség növelése. A  $k$ -érték csökkentése nem javasolt, mert akkor az interferencia veszélye, vagyis hogy két kromatográfias csúcs együtt eluálódjon, jelentősen megnő (romlik a felbontás). A hagyományos (konvencionális) kolonnákat (100-250 mm), hagyományos HPLC-készülékekben a megengedett kolonnán kívüli zónaszéledéssel (oszlopon kívüli diszperzió) használhatjuk. Amennyiben a kolonnahosszakat lecsökkentjük 20-50 mm-re, akkor kb. ötödére csökken az elemzési idő, amivel ugyan a gyorsasági kritérium teljesül, de ez együtt jár a felbontás csökkenésével, hiszen a kinetikai hatékonyság az elérhető tányérszámoktól, a kolonna hosszától függ. Annak érdekében, hogy ne változzon az elválasztás minősége, a kisméretű kolonnák kinetikai hatékonyságát jelentősen meg kell növelni. Az elválasztás úgy is gyorsítható, ha megnöveljük a mozgófázis sebességét, mivel a lineáris áramlási sebesség növelése fordított arányban áll az elemzési idővel. A gyors folyadékkromatográfia definícióját szem előtt tartva, kolonnatechnológiai szempontból kisméretű, 50 mm hosszú és 2,1 mm belső átmérőjű kolonnákat használunk, amelyek 3  $\mu\text{m}$  alatti héjszerű, 2  $\mu\text{m}$  alatti teljesen porózus szemcsés, vagy második generációs monolit töltetet tartalmaznak. A kinetikai hatékonyság ezeknél a kolonnáknál csak kismértékben romlik a mozgófázis lineáris áramlási sebességének növelésével.



### 1.2.1. Elvárások egy gyors kromatográfias mérésekre alkalmas készülékkel szemben

A készülékekkel szemben két fő elvárásunk lehet: az egyik a működtetési nyomástartomány növelése, a másik pedig az oszlopon kívüli térfogatok csökkentése. Az első elvárás egyértelmű, minél nagyobb nyomáson tudunk dolgozni egy készülékkel, annál több lehetőségünk van az elválasztás gyorsítására, illetve a felbontás javítására. A második elvárás kicsit összetettebb, kompromisszumokból tevődik össze. A folyadékkromatográfias rendszerben az áramlás jellege lamináris, ebből az következik, hogy az oszlopon kívül minden olyan térfogaton, ahol áthalad a minta, a zónája folyamatosan szélesedik. Ezt nevezik kolonnán kívüli, térfogati zónaszélesítő hatásnak, amelyet térfogategységekben fejezünk ki, és a következőkből tevődik össze: az injektált térfogatból, az adagolót és a kolonnát, valamint a kolonnát és a detektort összekötő vezetékben történő zónaszélesedésből, továbbá UV-detektornál még a cellatérfogat hatásából. A kromatogramon mért zónaszélesedés tehát két fő részből áll, az egyik a kolonna által megszabott ( $\sigma_{\text{col}}^2$ ), a másik a kolonnán kívüli ( $\sigma_{\text{ec}}^2$ ), ezek összege adja a teljes zónaszélesedést ( $\sigma_{\text{total}}^2$ ):

$$\sigma_{\text{total}}^2 = \sigma_{\text{ec}}^2 + \sigma_{\text{col}}^2. \quad (1.22)$$

Az összefüggésből következik, hogy a készüléken akkor tapasztalnánk közel  $\sigma_{\text{col}}^2$  nagyságú zónaszélesedést, ha ehhez képest elhanyagolható lenne a  $\sigma_{\text{ec}}^2$  járuléka.

Az oszlopon kívüli káros – hatékonyságot rontó – tényezők annál jelentősebbek, minél kisebb a kolonnaméret, és minél hatékonyabb a kolonna. Megállapodás szerint az oszlopon kívüli zónaszélesedés összege nem lehet nagyobb, mint a kolonnán mért csúcshélesedés tizede:

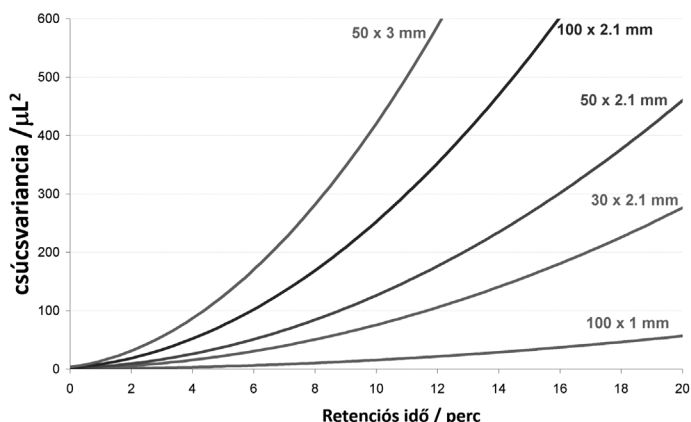
$$\sigma_{\text{ec}}^2 \leq 0,1 \cdot \sigma_{\text{col}}^2. \quad (1.23)$$

A csúcshélesedést (varianciát) térfogatnégyzet vagy időnégyzet dimenziójú mennyiségekkel tudjuk kifejezni. Az oszlopon létrejövő csúcs varianciáját a következő összefüggéssel írhatjuk le:

$$\sigma_{\text{col}}^2 = \frac{V_r^2}{N_{\text{col}}} = \frac{V_0^2}{N_{\text{col}}} (1+k)^2, \quad (1.24)$$

ahol  $V_r$  a retenciós térfogat,  $N_{\text{col}}$  az elméleti tányérszám és  $V_0$  az oszlop holtterfogata; tehát minél kisebb a kolonna térfogata és a komponens visszatartása, illetve minél hatékonyabb a kolonna, annál kisebb az eluálódó csúcs varianciája. Az 1.1. ábrán a 2  $\mu\text{m}$ -nél kisebb szemcsékkel

töltött kis térfogatú kolonnák csúcsvarianciáját szemléltetjük a retenció függvényében.



1.1. ábra. Oszlopon létrejövő csúcsvariancia (2  $\mu\text{m}$ -nél kisebb tölteten) a retenció tényező függvényében

A látszólagos tányérszám ( $N_{\text{app}}$ ) felírható a kolonna által teljesített saját tányérszám ( $N_{\text{col}}$ ) és az oszlopon létrejövő, illetve azon kívüli varianciák viszonyával:

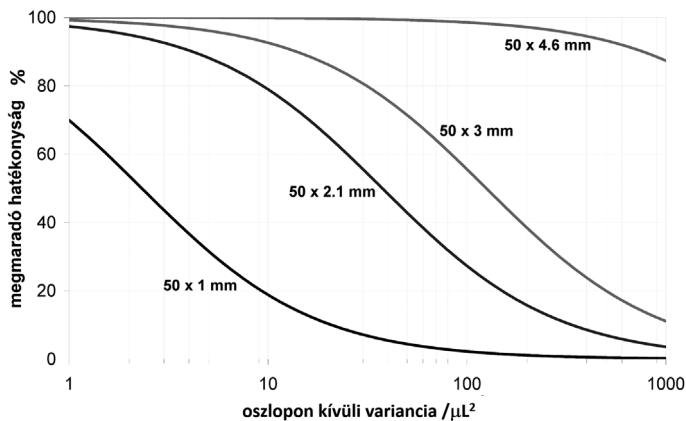
$$N_{\text{app}} = N_{\text{col}} \frac{1}{1 + \frac{\sigma_{\text{ec}}^2}{\sigma_{\text{col}}^2 + \sigma_{\text{ec}}^2}}, \quad (1.25)$$

Az ún. megmaradó kolonnahatékonyság ( $E_r$ ) egyszerűen felírható a következő módon:

$$E_r = 100 \cdot \frac{\sigma_{\text{col}}^2}{\sigma_{\text{col}}^2 + \sigma_{\text{ec}}^2} \approx \frac{V_0}{V_{\text{ec}}}. \quad (1.26)$$

Az alábbi példában különböző átmérőjű kolonnák megmaradó hatékonyságát mutatjuk be az oszlopon kívüli variancia függvényében ( $k = 5$  visszatartást feltételezve).

Az 1.2. ábráról jól látszik, hogy a 4,6 mm átmérőjű kolonnákat használhatjuk bármilyen készülékben anélkül, hogy a látszólagos hatékonyság csökkenne. Hagyományos HPLC-készülékek oszlopon kívüli csúcsvarianciája 40-200  $\mu\text{L}^2$  közé esik, míg az UHPLC-készülékek 4-9  $\mu\text{L}^2$ -rel járulnak hozzá a kromatográfias csúcs szélesedéséhez.<sup>1</sup> Azok a készülékek, amelyeket a gyártók mind a hagyományos HPLC-s, mind pedig az UHPLC-s elválasztásokhoz javasolnak (ún. hibrid készülékek), általában

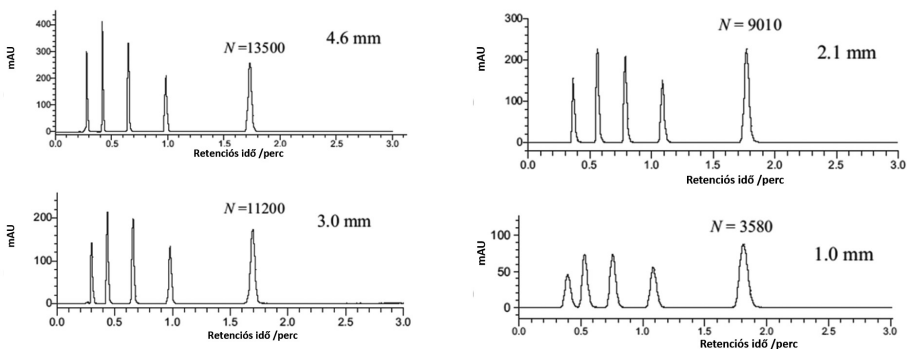


1.2. ábra. Megmaradó hatékonyság az oszlopon kívüli variancia függvényében  $50 \times 4,6$ ,  $50 \times 3$ ,  $50 \times 2,1$  és  $50 \times 1$  mm kolonnaméretekre ( $1,7 \mu\text{m}$  névleges szemcseátmérő)

$10\text{-}40 \mu\text{L}^2$ -rel járulnak hozzá a csúcs szélesedéséhez.<sup>1</sup> A 2011-ben megjelent legújabb fejlesztésű UHPLC-készülék (Waters UPLC I-Class) oszlopon kívüli varianciája, a mérés körülményeitől függően,  $0,5\text{-}4 \mu\text{L}^2$  közé esik, tehát a legkorszerűbb UHPLC-készülékeket alkalmazva is jelentős mértékű hatékonyságot veszíthetünk. Elsősorban  $1 \text{ mm}$  és  $2,1 \text{ mm}$  átmérőjű kolonnák esetén nem tudjuk kihasználni a jelenlegi kolonnatechnológia valódi lehetőségeit, ugyanakkor jó kompromisszumnak tűnik a  $3 \text{ mm}$  átmérőjű kolonnák használata, persze ekkor az analízisidő rovására tudjuk csak a hatékonyságot fokozni.

Nemrég Wu és Bradley mutatta be az  $1,8 \mu\text{m}$ -es szemcsékkel töltött,  $50 \text{ mm}$  hosszú kolonnák látszólagos hatékonyságromlását.<sup>2</sup> Tanulmányukban  $1$ ,  $2,1$ ,  $3$  és  $4,6 \text{ mm}$  átmérőjű kolonnákat működtettek egy Waters Acquity UPLC-készüléken, melynek oszlopon kívüli térfogatát  $11,4 \mu\text{L}$ -nek mérték. A mért tányérszámokat az 1.3. ábra mutatja a különböző átmérőjű kolonnákra, és – az elméletnek megfelelően – drasztikus hatékonyságvesztést tapasztaltak a  $2,1$  és a  $1 \text{ mm}$  átmérőjűek esetén. Lestremau és Szűcs hasonló látszólagos hatékonyságromlásról számolt be gradiens elúcióban, amikor  $1 \text{ mm}$  átmérőjű kolonnát használtak egy UPLC-készülékben.<sup>3</sup>

A „standard” konfigurációjú készülékek okozta zónaszélesedés csökkenthető, ha csökkentjük az összekötő vezetékek átmérőjét és hosszát, illetve ha a beépített „standard” detektorcellát ún. mikro- vagy szemimikrocellára cseréljük. Egy Acquity UPLC-rendszer oszlopon kívüli varianciája  $2 \mu\text{L}^2$ -re csökkenthető (eredetileg  $5\text{-}8 \mu\text{L}^2$ ), ha a  $0,127 \text{ mm}$  átmérőjű



1.3. ábra. Látszólagos hatékonyságcsökkenés a kolonna átmérő csökkentésével (5 cm-es kolonnák, 1,8  $\mu\text{m}$  szemcseátmérő, Acquity UPLC-készülék)

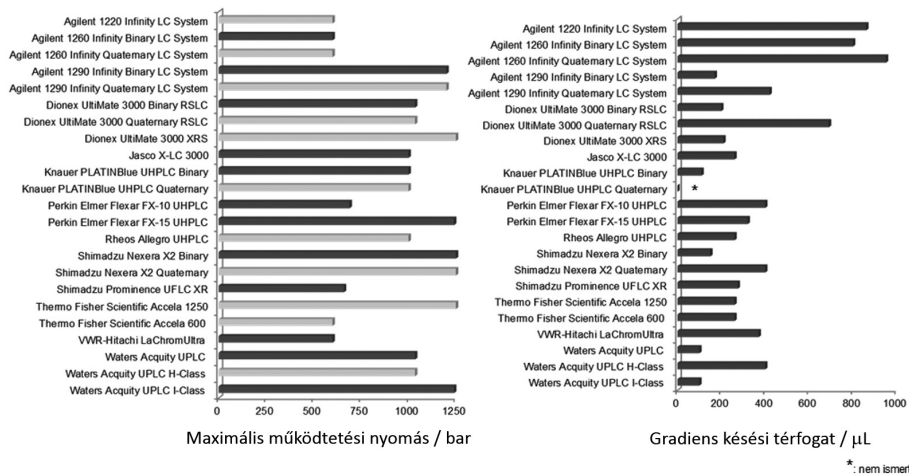
összekötő vezetékeket 0,0635 mm-esekre cseréljük.<sup>2</sup> Guiochon és mtsai. bemutatták, hogy egy konvencionális Agilent 1100-as HPLC-készülék varianciája akár 5-10  $\mu\text{L}^2$ -re csökkenthető (eredetileg 80-100  $\mu\text{L}^2$ ), ha az eredeti konfigurációban alkalmazott összekötő vezetékeket, injektor tű-talp (*needle seat*) kapillárist, és a detektorcella-térfogatot optimalizáljuk.<sup>4</sup> Hasonló módon optimalizáltak Alexander és mtsai. egy Waters Alliance 2695 HPLC-rendszert, és végül 15  $\mu\text{L}^2$ -re csökkentették az oszlopon kívüli varianciát.<sup>5</sup> Omamogho és mtsai. egy Agilent 1200 HPLC-rendszer varianciáját csökkentették sikeresen 3-4  $\mu\text{L}^2$ -re úgy, hogy a 0,17 mm átmérőjű összekötő vezetékeket 0,11 mm-esekre cserélték, illetve az eredetileg 6  $\mu\text{L}$ -es detektorcella helyett 1,7  $\mu\text{L}$ -es cellát alkalmaztak.<sup>6</sup>

A kolonnán kívüli csúcshéledéshez az adagolt minta térfogata is hozzájárul, melyet úgy csökkenthetünk, ha a mintát a kolonna elején fókuszáljuk. Farkas és mtsai. nemrég mutatták be, hogy az általuk bevezetett „hatékonyságoptimalizáló injektálási szekvencia” (POISE, Performance Optimizing Injection Sequence) akár 10-20%-ban növelheti a látszólagos hatékonyságot kis visszatartású komponensekre ( $k < 3$ ).<sup>7</sup> A módszernek az a lényege, hogy egy viszonylag rossz oldószerből meghatározott mennyiségű „dugót” használunk a mintazóna után.

Összességében megállapíthatjuk, hogy jelenleg a kolonnatechnológia „elhaladt” a készülékfejlesztések mellett, és elsősorban új, még kisebb oszlopon kívüli térfogatokkal rendelkező készülékek fejlesztése a cél annak érdekében, hogy a meglévő kolonnákat megfelelően tudjuk üzemeltetni.

Egy másik kérdéskör, ami szorosan kapcsolódik a készülék térfogathoz, az ún. gradiens késési vagy gradiens késletetési idő/térfogat (*dwell time/volume*). Manapság a legtöbb folyadékkromatográfias elválasztást (mind ipari, mind akadémiai laboratóriumokban) gradiens elúciós módban végzik

(a mozgófázisban a nagyobb elúciós erősségű oldószer koncentrációját növelik, ezt nevezik „B” oldószernek, ami általában acetonitril vagy metanol). A „B” oldószer koncentrációját növeljük az idő függvényében, ezáltal csökken a nagyobb  $n$ -oktanol/víz megoszlási hányadossal ( $\log P$ ) rendelkező komponensek retenciója. A gradiens elúciónak ezt a módját oldószergradiensnek nevezik. A késleltetési térfogat a nagynyomású gradiens elúciós készülékeknél összetevődik a keverő, továbbá a keverőt, az adagolót és a kolonnát összekötő kapillárisok, valamint az adagoló térfogatából; kisnyomású gradiens készüléknél ehhez hozzájárul még a nagynyomású szivattyú térfogata is. Mindezeket a térfogatokat, melyeken a mozgófázisnak át kell haladnia ahhoz, hogy a kolonna elejére érjen, a gradiens késleltetési térfogattal ( $V_D$ ) jellemezzük. Amíg a nagy- és a kisnyomású hagyományos HPLC-készülékeknél a  $V_D$  értéke általában 0,5 és 2 mL között változik, addig a korszerű UHPLC-készülékek tipikusan 0,08-0,5 mL  $V_D$ -vel rendelkeznek. Készülékünk gradiens késési térfogatát ismerni kell, ennek elsősorban módszerek átvételekor és átadásakor (transzfer) lehet nagy jelentősége.

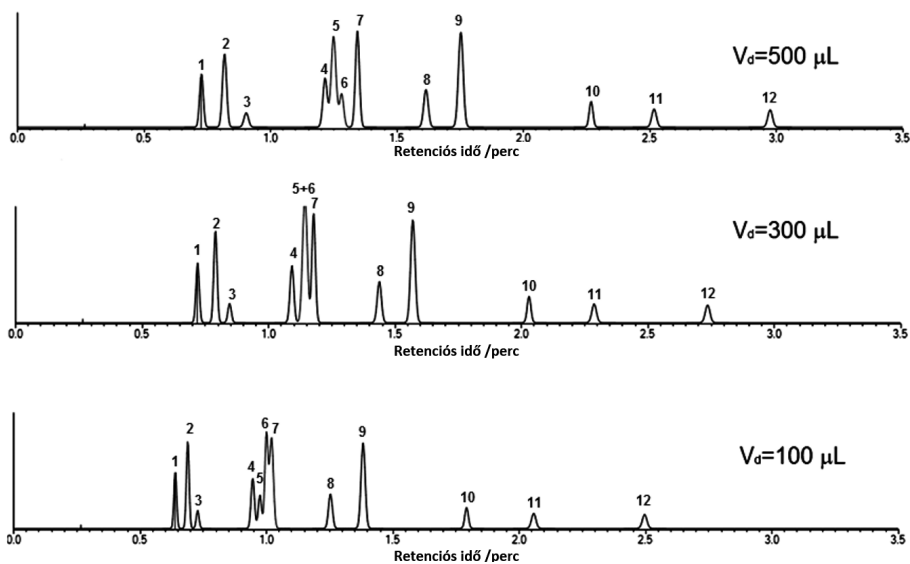


1.4. ábra. Kereskedelmi forgalomban kapható UHPLC-készülékek maximális működtetési nyomása és gradiens késleltetési térfogata

A  $V_D$  egyszerűen meghatározható, amire több módszer is elterjedt.<sup>8</sup> Minden módszer azon alapszik, hogy az egyik mozgófázis nem UV-aktív (pl. víz), a másik mozgófázisba pedig valamilyen UV-aktív komponenst (pl. acetont) keverünk kis mennyiségben. Az oszlopot eltávolítjuk, majd egyszerűen csak összekötjük a kolonnába be- és a kolonnából kivezető csöveket. Beállítunk egy gradiens programot, és a mért UV-jelet összehasonlítjuk a beállított programmal. A kromofort tartalmazó „B”

eluens jele nyilván késik a beállított programhoz képest; ezt az időbeli késést mérjük, majd az alkalmazott térfogatáram ismeretében könnyen ki tudjuk számolni a  $V_D$ -t. Az 1.4. ábra a jelenleg kereskedelmi forgalomban kapható UHPLC-készülékek maximális működtetési nyomását és gradiens késleltetési térfogatát mutatja be.<sup>9</sup>

Az 1.4. ábrán jól látszik, hogy eléggé változatos a jelenlegi készülékek gradiens késleltetése. Gyakori a gyógyszer-analitikában, hogy régebbi, meglévő konvencionális HPLC-módszereket transzferálunk UHPLC-módszerré. Ennek fordítottjára is szükség lehet, amikor az UHPLC-módszereket kell hagyományos oszlopra/készülékre átdolgozni, mert az átvevő laboratóriumban csak az áll a rendelkezésre. Vegyünk egy egyszerű példát! UHPLC-ben tipikusan 0,5 mL/perc térfogatárammal dolgozunk. Ekkor ha a készülékünk gradiens késési térfogata 0,5 mL, akkor éppen 1 percet „késik” a gradiens program, viszont ha  $V_D = 0,1$  mL, akkor csak 0,2 perc késésünk lesz, így a két készüléken mért komponensek retenciósideje között tehát 0,8 perc különbség várható. A kevésbé visszatartott komponensek esetén különösen kritikus lehet a gradiens késés változása, továbbá sokszor a felbontás, és néha még a szelektivitás, is változhat.



1.5. ábra. A készülék gradiens késési térfogatának hatása gyors kromatográfias elválasztásokra. Oszlop: Halo C18,  $100 \times 2,1$  mm,  $2,7 \mu\text{m}$ , mozgófázis: víz-acetonitril gradiens (15% B-90% B / 4 perc), térfogatáram: 0,8 mL/perc.

Komponensek: (1) ftálsav, (2) vaníliásav, (3) izo-vaníliásav, (4), antranilsav, (5) vanillin, (6) 4-hidroxi-3,5-dimetoxibenzaldehid, (7) ferulasav, (8) *orto*-vanillin, (9) benzoésav, (10) *transz*-2,4-dimetoxi-fahéjsav, (11) metilbenzoát, (12) etilbenzoát

A kis gradiens késleltetésű készülékeknél egy kezdeti izokratikus szakasz beiktatásával növelhetjük a „látszólagos” gradiens késést, a nagyobb gradiens késleltetésű rendszerek esetén pedig a gradiens programot nem az elejétől, hanem a késésnek megfelelő időhöz tartozó kiindulási mozgófázis összetételétől kell indítani, ha azt akarjuk, hogy hasonlítson a kromatogram a kisebb késleltetésű rendszeren mérthez. Módszertranszferálásnál az ún. „geometriai transzfer szabályok” mellett a gradiens késési idő és oszlopholdidő arányát ( $t_p/t_0$ ) kell állandó értéken tartani.

Nyilván annyira érdemes a gradiens késést csökkenteni, amennyire csak lehet, de a végtelen csökkentésnek határt szab az a körülmény, hogy ha nem áll rendelkezésre a mozgófázisok keveredéséhez megfelelő térfogat/idő, akkor a nem tökéletes keveredés miatt a módszer reprodukálhatósága nem lesz megfelelő. Ez nagy térfogatáramoknál különösen kritikus lehet, akár pulzálás is felléphet. Az 1.5. ábrán szemléltetjük a gradiens késési térfogat hatását, a példában 500, 300 és 100  $\mu\text{L}$ -es gradiens késéssel rendelkező készülékeken mért kromatogramokat mutatunk be. Látható, hogy a kevésbé visszatartott komponensek (1-7) esetén a csúcsefelbontás nagyban függ a készülék késési térfogatától.<sup>9</sup>

## 1.2.2. Fejlesztések a kolonnatechnológiában

Halász István és munkatársai az elsők között mutatták meg, hogy elméletileg az elválasztás annál gyorsabb lehet, minél kisebb a töltet szemcseátmérője.<sup>10</sup> Arra is felhívták a figyelmet, hogy az elválasztás várható idejének a készülékek maximális működtetési nyomása szab határt. A szemcseátmérő és kolonnadimenziók csökkentése azóta is folyamatos trend maradt a folyadékkromatográfiában. Itt röviden összefoglaljuk a jelenlegi fejlesztések lehetőségeit, határait, és gyakorlati példákon keresztül bemutatjuk a lehetséges gyógyszer-analitikai alkalmazásokat.

### 1.2.2.1. Teljesen porózus, kis szemcseátmérőjű töltetek

Az eredeti, van Deemter által leírt (1.6) összefüggés annak ellenére, hogy csak egy empirikus közelítés, szemléletessége és egyszerűsége miatt ma is használatos a kolonnák jellemzésére. A szemcseátmérőnek ( $d_p$ ) és a diffúziós tulajdonságoknak (diffúziós állandó,  $D_M$ ) az elválasztás hatékonyságára gyakorolt szerepét pedig az (1.7) összefüggéssel felírt Neue-egyenlet adja meg.



Hangsúlyozzuk, hogy az (1.7) egyenlet sok elhanyagolást tartalmaz, ezek közül kiemelünk néhányat. A diffúziós állandó nem azonos a szemcsék közötti folyadék fázisban és a szemcsén belüli stagnáló folyadékban, az örvénydiffúzió a valóságban nem független a lineáris sebességtől, vagy az egyenlet nem különbözteti meg az anyagátadás álló-, illetve mozgófázis szerinti járulékát. Első közelítésben viszont jól szemlélteti, hogy az örvénydiffúzió egyenesen arányos a szemcseátmérővel, míg az anyagátadási tag a szemcseátmérő négyzetétől függ. Az egyenletből egyértelműen következik, hogy a szemcseátmérő csökkentése jelentős tányérmagasság-csökkenést (tányérszám-növekedést) eredményez. Másik következmény, hogy az egyenlet által leírt görbe minimum helye a nagyobb lineáris sebességi tartományba tolódik, ha a szemcseátmérőt csökkentjük. A függvény optimumának (minimumának) helye ott van, ahol a  $dH/du = 0$  feltétel teljesül, ekkor pedig az optimális lineáris sebesség ( $u_{opt}$ ) az (1.8), illetve az ennek megfelelő legkisebb tányérmagasság ( $H_{min}$ ) az (1.9) egyenletből olvasható ki. Belátható tehát, hogy a szemcseátmérő csökkentése előnyös az elválasztás gyorsításának és a kinetikai hatékonyság növelésére.

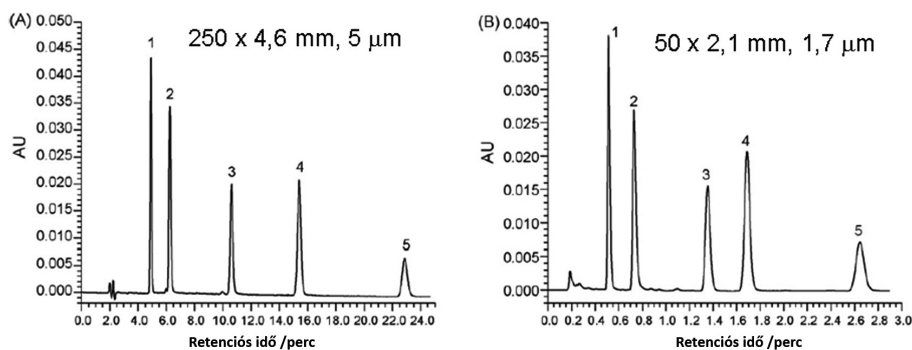
Folyadékromatográfiai körülmények között, ahol a lineáris áramlási sebességek kicsik, az áramlás lamináris jellegű, ezért az (1.15) egyenlet alakjában megfogalmazott Darcy-törvény jól alkalmazható, ennek értelmében tehát a szemcseátmérő csökkenésével a kolonnán létrejövő nyomásesés négyzetesen növekszik. A különböző cégek által forgalmazott azonos átlagos szemcseátmérőjű töltetet tartalmazó kolonnákon a nyomásesés azonban eltérő lehet, ami két okra vezethető vissza. Az egyik szerint a nagyobb nyomásesésű kolonnán a szemcseátmérő méreteloszlása nagyobb, és a kisebb szemcseátmérőjű töltet nagyobb frakciót képvisel. A másik lehetőség, hogy a töltés során a szemcsék sérülnek, és a kis szemcseátmérőjű törmelék elzárja az áramlási csatornákat. További eltérést okozhat az is, hogy a különböző oszlopgyártók más-más kolonnátöltési technológiát alkalmaznak, aminek következtében a töltet sűrűsége eltérő lehet.

Az elválasztási sebesség növelésének határt szab a készülék maximális nyomásteljesítménye, a hagyományosnak tekinthető HPLC-nél ez 400 bar. Jelenleg szinte már minden készülégyártó forgalmaz UHPLC-készüléket, amelyek 1200-1300 bar tartományig is képesek a mozgófázist szállítani. Az UHPLC-s elválasztások hatékonyságát két hatás külön-külön vagy együttesen is leronthatja. Az első hatás abból ered, hogy a nagy nyomással bevitt energia hővé alakul, amelynek eredményeképp hossz- és keresztirányú hőmérséklet-gradiens alakul ki a kolonnán, aminek következményeként a



csúcshévesedés nőhet. A másik hatás, amely együtt jár a nagy nyomással, az az, hogy a retenciós tulajdonságok megváltozhatnak.<sup>11</sup> A környezetnek történő hőátadás a kolonnaátmérőtől függ; minél kisebb a kolonnaátmérő, annál nagyobb az egységnyi kolonnatérfogatra jutó hőátadó felület. Ebből következik, hogy ekkor inkább a 2 mm körüli, vagy az alatti, kolonnák alkalmazása teszi lehetővé, hogy ne alakuljanak ki olyan hőmérséklet-különbségek, amelyek jelentős csúcshévesedést okoznak (súrlódási hőeffektusok). A kis kolonnaátmérő alkalmazásakor viszont előtérbe kerülnek a korábban említett, kolonnán kívüli zónaszélesítő hatások és az abból eredő problémák.

Az első UHPLC-készülékekhez kifejlesztett, teljesen porózus 1,7  $\mu\text{m}$  átlagos szemcseátmérőjű szerves és sziloxánból („ethylene-bridged hybrid”, BEH) készült töltet 2004-ben, az első UPLC-készülék megjelenésével egy időpontban került kereskedelmi forgalomba.<sup>12,13</sup> A szemcse teljesen gömbszimmetrikus, a felületén nincsenek kiugrások vagy mélyedések, ami több szempontból is fontos: egyrészt a mechanikai stabilitás miatt, másrészt pedig kisebb a szemcsét körülvevő álló folyadékfilm okozta zónaszélesedés (filmdiffúzió). A töltet szemcseátmérő-eloszlása is kisebb a hagyományos HPLC-s töltetekéhez képest. A szakirodalomban jelenleg is vita van a szemcseátmérő-eloszlás szerepéről, elsősorban a kinetikai hatékonyságra gyakorolt hatásáról (örvénydiffúzió, töltetsűrűség, töltési tulajdonságok); műveleti szempontból előnyös a kis szemcseátmérő-eloszlás.<sup>14</sup> Wang és mtsai. az elsők között mutatták be, hogy a hagyományos HPLC-s módszerek (250 mm-es, 5  $\mu\text{m}$ -es kolonna, 400 bar nyomás) analízisideje akár a hetedére is csökkenthető 50 mm-es 1,7  $\mu\text{m}$ -es Acquity BEH kolonnát és 900-1000 bar nyomást alkalmazva.<sup>15</sup> Az 1.6. ábrán egy hagyományos módszer gyors módszerre történő sikeres transzferálásának eredményét láthatjuk.



1.6. ábra. Izokratikus hagyományos HPLC-eltávolítás UHPLC-s felgyorsítása gyógyszerhatóanyagok eltávolítására

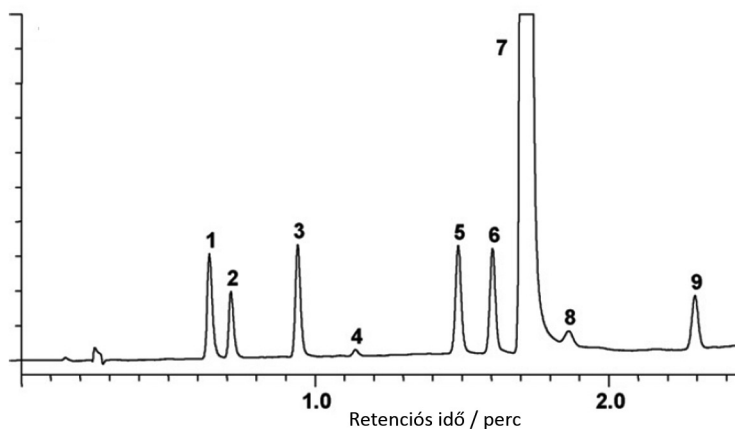
1.1. táblázat. Kereskedelmi forgalomban megjelent (2014-ig) 2 µm-es és az alatti töltetek

gyártó	kolonnatöltet neve	névleges szemcseátmérő /µm
Advanced Materials Technology	Halo 2	2,0
Alltech (Grace Davison)	VisionHT	1,5
Shant Laboratories	Pathfinder	1,5
Waters	Cortecs, Acquity-BEH, -CSH, -HSS	1,6, 1,7, 1,8
Fortis Technologies	Fortis 1.7	1,7
Orochem Technologies	Gazelle	1,7
Phenomenex	Luna, Aeris, Kinetex	2,0, 1,7, 1,3
Sepax	GP-8 and GP-18	1,7
Thermo	Syncronis, Hypersil Gold	1,7, 1,9
Agilent Technologies	Zorbax Rapid Resolution HT/HD	1,8
Bischoff	ProntoPEARL TPP Ace-EPS	1,8
ES Industries	Epic Sub-2	1,8
Knauer	BlueOrchid	1,8
Macherey-Nagel	Nucleodur	1,8
MicroSolv Technology	Cogent Diamond & Silica-C	1,8
Micro-Tech Scientific	Microsil	1,8
Perkin Elmer	BrownLee	1,9
Restek	Pinnacle DB/ Ultra II	1,9
Sigma-Aldrich	Titan	1,9
YMC	Triart, Ultra-HT	1,9, 2,0
Varian	Pursuit UPS	1,9
Agela Technologies	Rapid aSB	2,0
Hitachi	LaChromUltra	2,0
Imakt	Presto	2,0
Shiseido	Capcell Pack	2,0
Tosoh Haas	TSKgel SuperODS	2,0
Zirchrom	Zirchrom	2,0

Az Acquity BEH 1,7 µm-es töltet sikere után hamarosan más gyártók is forgalomba hozták 2 µm-es vagy az alatti töltetüket. Először az Agilent Zorbax RHD 1,8 µm-es, a Thermo Hypersil Gold 1,9 µm-es, majd a Grace

Vision HT 1,5  $\mu\text{m}$ -es töltetei jelentek meg a piacon. Mára már szinte minden kolonnagyártó cég ajánlja a saját teljesen porózus UHPLC-s töltetét. Az 1.1. táblázat 2014-ig foglalja össze a kereskedelmi forgalomban megjelent 2  $\mu\text{m}$ -es és az alatti tölteteket.

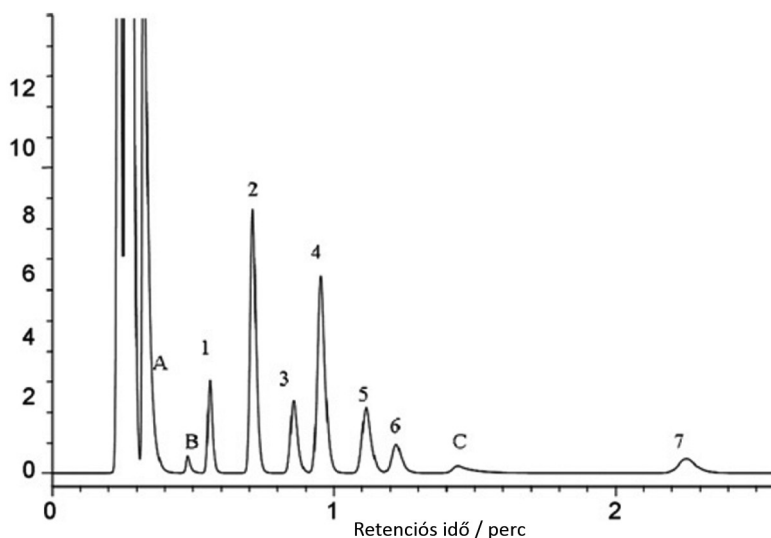
A 2  $\mu\text{m}$  alatti töltetekkel abszolút értékben igen kis tányérmagasságokat ( $H_{\text{min}}$ ) érünk el, az eltérő szemcseátmérőjű töltetek összehasonlításánál használt redukált tányérmagasság ( $h = H/d_p$ ) minimuma ezeknél elmarad a 3-5  $\mu\text{m}$ -es töltetekhez képest. A redukált tányérmagasság egy dimenziómentes mérőszám, mellyel a különböző szemcseméretű kolonnák hatékonyságát vethetjük össze függetlenül a szemcsemérettől. Az elmélet szerint egy jól töltött, teljesen porózus töltetű kolonnánál  $h = 2-2,5$  közötti értéket kell kapnunk. A 2  $\mu\text{m}$  alatti töltetek hatékonysága azonban a gyakorlatban elmarad az elméletileg elvárhatótól ( $h_{\text{min}} \sim 3$ ), aminek több oka lehet: a korábban említett hőeffektus vagy a kolonnatöltési technológia, hogy csak két kritikus tényezőt emeljünk ki.



1.7. ábra. Etinilösztadiol-tartalmú készítmény bomlásvizsgálata. Kolonna: Restek Pinnacle C18 1,9  $\mu\text{m}$  (50 mm  $\times$  2,1 mm), mozgófázis: „A”: acetonitril-víz 5-95 V/V%, „B”: acetonitril, gradiens program (35% B-70% B, 2,3 perc alatt), térfogatáram: 0,5 mL/min, oszlophőmérséklet: 50  $^{\circ}\text{C}$ , injektálási térfogat: 1  $\mu\text{L}$ , detektálás: 220 nm. Komponensek: (1) 6- $\alpha$ -hidroxi-etinilösztadiol, (2) 6- $\beta$ -hidroxi-etinilösztadiol, (3) 6-keto-etinilösztadiol, (4) ismeretlen bomlástermék, (5) ösztadiol, (6) 9,11-dehidro-etinilösztadiol, (7) etinilösztadiol, (8) ismeretlen bomlástermék és (9) ismeretlen szennyező

Az alábbiakban néhány korszerű gyógyszer-analitikai példát mutatunk be a teljesen porózus 2  $\mu\text{m}$  alatti töltetek alkalmazására. Etinilösztadiol-tartalmú készítmény tisztaságvizsgálati módszere során 8 szennyezőt/bomlásterméket választottak el egymástól és a hatóanyagtól mindössze 2,5

perc alatt.<sup>16</sup> A tanulmányban 1,9  $\mu\text{m}$ -es C18-as szemcsékkel töltött  $50 \times 2,1$  mm-es kolonnát és egyszerű acetonitril-víz lineáris gradienst alkalmaztak (1.7. ábra). A módszer érdekessége, hogy hasonló feladatra 30-60 perces konvencionális HPLC-s elválasztások találhatók az irodalomban ( $150 \times 4,6$  és  $250 \times 4,6$  mm-es kolonnákon).



1.8. ábra. Szteroidgyártósor szilikonfelületéről vett minta kromatogramja. Kolonna: UPLC BEH C18 1,7  $\mu\text{m}$  ( $50 \times 2,1$  mm), mozgófázis: acetonitril-víz (48:52, *V/V*), térfogatáram: 0,55 mL/perc, oszlophőmérséklet: 50 °C, injektált térfogat: 5  $\mu\text{l}$ , detektálás: 210 nm. Komponensek: (1) dienogeszt, (2) ösztradiol, (3) etinilösztadiol, (4) finaszterid, (5) gesztodén, (6) levonorgesztrel és (7) noretiszteron-acetát. A, B és C csúcsok a mintavételi hely (szilikon) anyagából kioldódó komponensek

Második példánkban készüléktisztítás, -validálás céljára mutatjuk be a 2  $\mu\text{m}$  alatti töltetek előnyét. A bemutatott izokratikus módszer alkalmas szteroidgyártósor tisztítási műveletének, illetve a készülékek tisztaságának megítélésére számos gyógyszerkészítmény gyártásakor.<sup>17</sup> A mindössze 3 perces elválasztással (1.8. ábra) hét hormonhatóanyagot (dienogeszt, finaszterid, gesztodén, levonorgesztrel, ösztradiol, etinilösztadiol és noretiszteron-acetát) lehet pontosan és torzítatlanul meghatározni rendkívül kis koncentrációban (meghatározási határ: 0,05-0,3  $\mu\text{g/mL}$ ). A módszer további érdekessége, hogy alkalmazható a készülékekben előforduló összes mintavételi felületre (rozsdamentes acél és PTFE alkatrészek, illetve szilikongumi anyagú tömítések, összekötő elemek).

### 1.2.2.2. Héjszerkezetű (mag-héj) töltetek

Az utóbbi évek legnagyobb sikerét egyértelműen a héjszerkezetű töltetek hozták, néhány év leforgása alatt alkalmazásuk gyakorisága összemérhetővé vált a teljesen porózus töltetekével. Elterjedésüknek egyik oka az, hogy a gyakorlatban alkalmazott működési (azaz a lineáris áramlási feltételeknek megfelelő) sebességtartományban a zónaszélesedés csökken az anyagátadási ellenállás csökkentésével. Utóbbi azzal érhető el, hogy az állófázis pórusaiban a diffúziós úthosszat lecsökkentjük, és lényegében ennek köszönhető a héjszerű töltetek jelenlegi reneszánsza. Horváth és Kirkland a 60-as évek legvégén vezették be ezeket a tölteteket, amelyeket akkor pellikulárisnak neveztek.<sup>18-20</sup> 50  $\mu\text{m}$ -es üvegyöngyöt használtak, amelyet 1  $\mu\text{m}$  vastagságban szerves polimer alapú ioncserélővel vettek körül, majd Kirkland 30-40  $\mu\text{m}$  átmérőjű töltetet készített 1  $\mu\text{m}$ -es aktív réteggel. Annak ellenére, hogy az ilyen típusú tölteteknek az anyagátadási ellenállása kedvezőbb, mint a hasonló méretű teljesen porózus töltetké, mégsem lettek népszerűek a folyadékkromatográfiás társadalomban. A kezdeti sikertelenség oka abban rejlik, hogy a nagy inaktív mag (az aktív réteghez képest) a kolonnák kis terhelhetőségét és visszatartásuk csökkenését vonta maga után. Az említett hibát a 2007-ben újból megjelent héjszerű tölteteken (harmadik generáció) már sikerült kiküszöbölni; a szemcseátmérő már 3  $\mu\text{m}$ -nél kisebb, az aktív réteg vastagsága pedig 0,35 és 0,5  $\mu\text{m}$  lett. Ennek megfelelően az aktív réteg aránya az összeshez képest 60-70%-ra módosult, ami viszont óriási áttörést hozott a gyors folyadékkromatográfiában. Az első 2,7  $\mu\text{m}$ -es héjszerkezetű töltetek Halo és Ascentis Express néven kerültek kereskedelmi forgalomba, s ismét Kirkland volt az, aki bevezette azokat.<sup>21</sup>



1.9. ábra. Héjszerkezetű töltetek sematikus képe (balra), illetve elektronmikroszkópos felvétele (jobbra)

Az alapkonceptió kezdetben az volt, hogy makromolekulák (fehérjék, peptidek) elválasztásának hatékonyságát úgy javítsák fel, hogy a diffúziós

úthosszat lecsökkentik, aminek következtében felgyorsulnak a szemcsén belüli anyagátadási folyamatok. A makromolekulák ugyanis lassú diffúzióval haladnak a porózus töltetekben, azaz lényegesen „lomhábbak”, mint a kismolekulák. Ha a töltet tartalmaz egy nem porózus magot, és ezt veszi körül az elválasztásban szerepet játszó aktív porózus réteg, akkor a lassú diffúziót (anyagátadási folyamatot) kompenzálhatjuk. Az 1.9. ábra a héjszerkezetű töltetek sematikus képét mutatja be.

Az újgenerációs héjszerkezetű töltetek kis szemcseméretéből adódik az előnyös örvény- és tengelyirányú diffúziós tulajdonság, a vékony porózus réteg következtében pedig gyorsabb részecskén belüli anyagátadás és kedvezőbb hosszirányú diffúzió várható. Kaczmarski és Guiochon levezetései alapján a részecskén belüli diffuzivitás a belsőmag-átmérő és a teljes szemcseátmérő hányadosának ( $\rho$ ) függvényében leírható,<sup>22</sup> és ahogy ez az arány növekszik ( $\rho = 1$  megfelel a nemporózus töltetnek, míg  $\rho = 0$  a teljesen porózusnak), úgy válik egyre gyorsabbá az anyagátadási kinetika az aktív héjban (van Deemter-összefüggés  $C$  tagja, nevezetesen az állófázis járuléka). Ez az előnyös tulajdonság elsősorban a nagy lineáris sebességeknél jelentkezik. Másrészt a hosszirányú diffúzióknak is csökkennie kell az inert belső mag miatt (van Deemter-összefüggés  $B$  tagja), aminek elsősorban a kis lineáris sebességi tartományban van jelentősége. Az általános sebességi elméletből az is levezethető, hogy az anyagátadás mozgófázis-járuléka is függ közvetve a héjvastagságtól, mert a visszatartás csökken a rétegvastagság csökkentésével.<sup>23</sup> Az elméleti levezetések szerint körülbelül 2,3-szer, illetve 1,7-szer gyorsabb részecskén belüli anyagátadás várható a kereskedelmi forgalomban kapható 2,6 és 2,7  $\mu\text{m}$ -es héjszerkezetű töltetekkel (Kinetex és Halo/Ascentis Express/Poroshell-120,  $\rho = 0,73$  és  $\rho = 0,63$ ), mint az azonos méretű teljesen porózus töltetekkel.

Teljesen porózus töltetekkel egy jól töltött kolonna esetén a legkisebb elérhető redukált tányérmagasság ( $h_{\min}$ ) 2,0, míg a jelenlegi héjszerkezetű töltetekkel 1,2-1,5 körüli  $h_{\min}$  várható és érhető el. Meg kell jegyeznünk, hogy az irodalomban található rendkívül jó hatékonysági adatok kromatográfiásan kis molekulákra nem magyarázhatók a jelenlegi elméletekkel. Kromatográfiásan kis molekulatömegű anyagok alatt azokat értjük, melyek egy 10 nm-es pórusátmérőjű töltet pórusaiban gátlás nélkül diffundálhatnak; ezek molekulatömege jellemzően 1000-2000 Da-nál kisebb. Több szerző is lényegesen kedvezőbb örvénydiffúziós tulajdonságot (van Deemter-összefüggés  $A$  tagja) figyelt meg a héjszerkezetű töltetekre, mint a teljesen porózusokra. Elvileg a szemcse szerkezetének nincs hatása az örvénydiffúzióra, ebben az esetben is máshol kell keresnünk a magyará-

zatot. Egyik magyarázat szerint a héjszerkezetű töltetek kis szemcseméret-eloszlással rendelkeznek, s ezért javul a kinetikai hatékonyságuk. A másik, kísérletileg bizonyított tény, hogy a viszonylag egyenetlen felületük miatt a töltésnél homogénebb töltetágy jön létre.<sup>24,25</sup> További előnyös tulajdonságukhoz sorolható, hogy a tömör magnak sokkal kedvezőbbek a hőátadási tulajdonságai, mint a porózus töltetnek, ezért a sűrűlódási hőeffektusok (mind a hossz-, mind a sugárirányúak) kevésbé jelentősek héjszerkezetű töltet esetén, így nagy lineáris sebességen tudunk dolgozni anélkül, hogy a fellépő sűrűlódási hő miatt drasztikusan csökkenne a kolonna hatékonysága vagy a komponens retenciója.

Az eddig tárgyalt előnyök mellett néhány hátrányos tulajdonságot is meg kell említeni. A vékony aktív porózus réteg miatt könnyen belátható, hogy az azonos méretű teljesen porózus töltethez képest kisebb a terhelhetőségük, és a visszatartás is csökken a kolonnában lévő összes felület arányában. A héjszerű töltetek aktív porózus része  $\sim 25\text{-}40\%$ -kal kisebb, mint a hasonló méretű teljesen porózus tölteteké. Kísérleti adatok alapján az a megállapítás született, hogy az újgenerációs héjszerkezetű töltetknél a terhelhetőség közel esik a  $2\ \mu\text{m}$ -nél kisebb teljesen porózus töltetekéhez.<sup>26,27</sup> Az is bebizonyosodott, hogy a visszatartás csökkenése a jelenlegi  $\rho = 0,6\text{-}0,8$  szemcseszerkezet esetén még nem kritikus,<sup>28</sup> elsősorban  $\rho > 0,8$  szemcseszerkezet esetén (pl. Aeris WP töltet) várható annak jelentős mértékű csökkenése.

Napjainkra szinte minden töltetgyártó forgalmaz újgenerációs héjszerkezetű állófázisokat. Először a  $2\text{-}3\ \mu\text{m}$  szemcseátmérő közötti töltetek jelentek meg, amelyeknél a héj vastagsága  $0,35\text{-}0,50\ \mu\text{m}$  között volt (Halo, Ascentis Express, Poroshell, Kinetex). Érdekes, hogy ezen töltetek átlagos pórusátmérője  $90\text{-}100\ \text{Å}$  közötti volt, holott a héjszerkezetű töltetek az elmélet szerint makromolekulákra teljesítenek jobban. Mára már megjelentek a  $160, 200$  és  $300\ \text{Å}$  körüli pórusátmérőjű héjszerkezetű állófázisok is (Halo Peptide ES, Aeris WP stb.), amelyek jó hatékonysággal alkalmazhatók fehérjeelválasztásokra.<sup>27,28</sup> Az 1.2. táblázatban a 2014-ig kereskedelmi forgalomban megjelent újgenerációs héjszerkezetű tölteteket foglaltuk össze. A  $2\ \mu\text{m}$  alatti szemcseméretű héjszerű tölteteken eddig nem tapasztalt kinetikai hatékonyságot érhetünk el, míg a  $3\text{-}5\ \mu\text{m}$  szemcseátmérőt a hagyományos teljesen porózus HPLC-s töltetek helyettesítésére javasolják a gyártók.

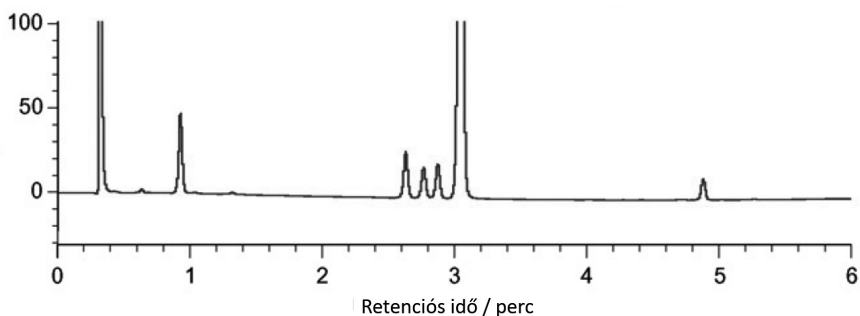
1.2. táblázat. Kereskedelmi forgalomban megjelent (2014-ig), újgenerációs héjszerkezetű töltetek

gyártó	kolonnatöltet neve	szemcseátmérő / $\mu\text{m}$	rétegvastag- ság / $\mu\text{m}$	$\rho$ ( $d_{\text{mag}}/d_{\text{szemcse}}$ )
ACE	UltraCore	2,5	0,45	0,64
		5,0	0,70	0,72
Agilent	Poroshell 120	2,7	0,50	0,63
	Poroshell 300	5,0	0,25	0,90
Advanced Material Technology	Halo-2	2,0	0,40	0,60
	Halo	2,7	0,50	0,63
	Halo Peptide-ES 160 Å	2,7	0,50	0,63
	Halo Protein 400 A	3,4	0,20	0,88
	Halo-5	4,7	0,60	0,74
Diamond Analytics	Flare Diamond Coreshell	3,6	0,10	0,94
Fortis	SpeedCore	2,6	0,40	0,69
Knauer	Blueshell	2,6	0,50	0,62
Macherey-Nagel	Nucleoshell	2,7	0,50	0,63
		5,0	0,60	0,76
Nacalai Tesque	Cosmocore	2,6	0,50	0,62
Perkin Elmer	Brownlee SPP	2,7	0,50	0,63
	Brownlee SPP Peptide-ES	2,7	0,50	0,63
Phenomenex	Kinetex	1,3	0,20	0,69
		1,7	0,23	0,73
		2,6	0,35	0,73
		5,0	0,60	0,76
	Kinetex EVO	5,0	0,60	0,76
	Aeris Peptide	1,7	0,23	0,73
		3,6	0,50	0,72
	Aeris Widepore	3,6	0,20	0,89
Sigma-Aldrich	Ascentis Express	2,7	0,50	0,63
	Ascentis Express Peptide-ES 160 Å	2,7	0,50	0,63
	BIOshell 400 A	3,4	0,20	0,88
	Ascentis Express 5 $\mu\text{m}$	4,7	0,60	0,74
Sunniest	SunShell	2,6	0,50	0,62
		4,6	0,50	0,75
Thermo Scientific	Accucore	2,6	0,50	0,62
	Accucore XL	4,6	0,50	0,75
Waters	Cortecs	1,6	0,25	0,70
		2,7	0,40	0,70
YMC	Meteoric Core	2,7	0,50	0,63



Az újgenerációs héjszerkezetű töltetek nagy sikerét bizonyítja, hogy a megjelenésük óta eltelt 6-7 év alatt rengeteg alkalmazást dolgoztak ki ilyen kolonnákra, az alábbiakban ezek közül mutatunk be néhányat.

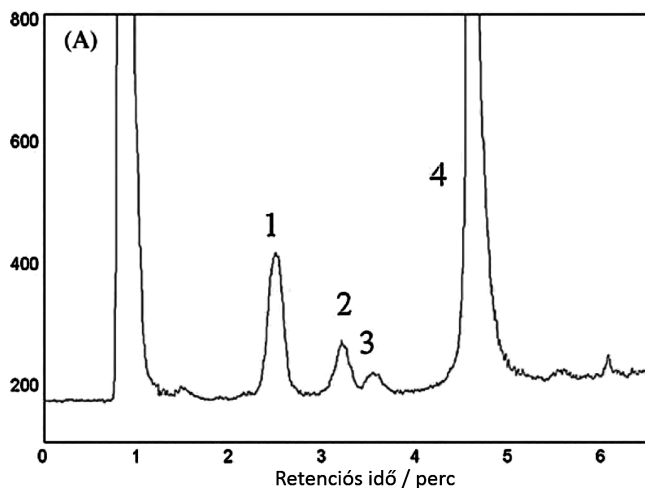
Silvestro és mtsai. klopidozról meghatározására fejlesztettek ki módszert farmakokinetikai tanulmányokhoz.<sup>29</sup> A módszerben 2,1 mm átmérőjű 5 µm-es, illetve 2,7 µm-es héjszerkezetű szemcsékkel töltött kolonnákat alkalmaztak. Egy másik tanulmány 1,8 µm-es teljesen porózus és 2,7 µm-es héjszerkezetű töltetek lehetőségeit hasonlította össze gyógyszerhatóanyagok elemzése céljából.<sup>30</sup> Elsősorban a kinetikai hatékonyságot, az oszlopok terhelhetőségét és az elérhető elválasztási időt tanulmányozták a szerzők, mely három tulajdonságot figyelembe véve a héjszerkezetű töltet előnyösebbnek bizonyult. Az 1.10. ábrán a hatóanyagok 5 perces gradiens elválasztását mutatjuk be 50 mm hosszú kolonnán.



1.10. ábra. Kannabinoid receptor-1 antagonist (CB-1), illetve intermedierjeinek és szennyezőinek elválasztása. Kolonna: Ascentis Express C18 2,7 µm (50 × 4,6 mm), mozgófázis: 0,1% foszforsav-acetonitril gradiens (10% B-95% B, 6 perc alatt), térfogatáram: 1,5 mL/perc, oszlophőmérséklet: 40 °C, injektált térfogat: 3 µL, detektálás: 220 nm

Heinig és mtsai. új gyógyszerjelöltek és metabolitjainak emberi plazmából történő meghatározására fejlesztettek ki UHPLC-tömegspektrometriás módszereket,<sup>31</sup> melyekben teljesen porózus és héjszerkezetű töltetek alkalmazásának lehetőségeit vizsgálták. Egy hasonló tanulmány szerzői a remifentanil hatékony és gyors meghatározásáról számolnak be,<sup>32</sup> melynek során 50 × 2,1 mm-es, 2,6 µm-es héjszerkezetű töltetet alkalmaztak. Egy gyors és érzékeny módszerben pedig poliszorbátot és polietilénlikolt (PEG) határoztak meg a szerzők fehérjetartalmú oldatokból szintén újgenerációs héjszerkezetű tölteteket alkalmazva.<sup>33</sup> Mivel a poliszorbátok és PEG-ek nem tartalmaznak kromofor csoportokat, a detektálást kondenzációs fényszórásos technika (CNLSD vagy NQAD™)

használatával sikerült megfelelő érzékenységre fejleszteni. Az 1.11. ábrán a PEG, a poliszorbát és a fehérje együttesének gyors meghatározását szemléltetjük.



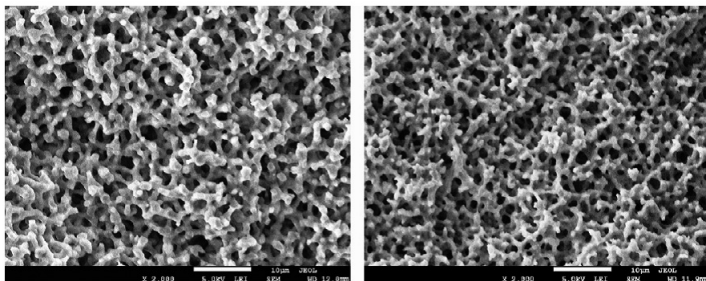
1.11. ábra. 10 mg/mL fehérjét, 40 µg/mL poliszorbát-20-at és 40 µg/mL PEG-et tartalmazó oldat komponenseinek gyors elválasztása. Kolonna: Kinetex C18 2,6 µm (100 mm × 3 mm), mozgófázis „A”: metanol-víz-trifluoecetsav 100:900:1 (V/V/V), mozgófázis „B”: 900:100:1 (V/V/V). Gradiens program: 83% B-100% B, 4,5 perc alatt, majd 100% B tartva 6,5 percig. Térfogatáram: 0,6 mL/perc; kolonnahőmérséklet: 30 °C; injektált térfogat: 5 µL. Komponensek: (1) PEG, (2) és (3): poliszorbát-20 fő alkotó komponensei, (4) fehérje

### 1.2.2.3. Monolit kolonnák

A monolit szó eredeti jelentése „nagy kő”. Kromatográfias szempontból ez alatt azt kell érteni, hogy egyetlen polimer adja a kolonnát, amelyben kétféle pórus található (szilikagél alapú monolitok esetén): a nagyobbik pórus átmérője 1-3 µm, ezt nevezzük átfolyó pórusnak, míg a szilárd polimerben található a mezopórusok, amelyek a komponensek megkötődését biztosítják. A kereskedelmi forgalomban mind szerves polimer, mind szilikagél alapú monolit kolonnák kaphatók.

Először a szilikagél alapú monolitok tulajdonságait foglaljuk össze. Úttörő munkát végeztek ezen a területen Hjertén, Svec, Horváth, Tanaka és az általuk kialakított műhelyek munkatársai.<sup>34-37</sup> Kereskedelmi forgalomban a Merck és a Phenomenex cég által forgalmazott termékek érhetők el (Chromolith, illetve Onyx néven). Míg az első generációs szilikagél alapú monolit 2000-ben került kereskedelmi forgalomba, addig

a továbbfejlesztett változat – amely a második generációs monolit nevet kapta – 2011-ben jelent meg. A töltetek elektronmikroszkópos felvételét az 1.12. ábrán mutatjuk be, melyen a világos részek adják a szilikagél alapvázat (*skeleton*), míg a sötét részek a nagy átmérőjű átfolyó pórusokat.<sup>38</sup>



1.12. ábra. Első (balra) és második (jobbra) generációs szilikagél alapú monolitok elektronmikroszkópos képei

A szerkezet olyan szivacsához hasonlít, amelyben a pórusok nyitottak és egymással összeköttetésben vannak, a mozgófázis áramlása ezekben a  $\mu\text{m}$ -es nagyságrendű pórusokban történik. Ahogy az 1.12. ábrán is jól látható, a pórusok átmérője közel állandó, amiből az következik, hogy az áramlási ellenállás oldaláról nézve nincsen szűk keresztmetszet (utóbbi a szemcsés töltetknél a legkisebb átmérőjű csatorna határozza meg). Töltetes kolonnánál az áramlási csatornák átmérőjét a szemcseátmérőből lehet becsülni, mely szabályos alakú, gömbszimmetrikus töltetknél általában a szemcseátmérő  $1/3$  része, így tehát egy  $3 \mu\text{m}$ -es töltetnél ez  $1 \mu\text{m}$ -nek felel meg. Ez csak akkor igaz, ha a töltés során a részecskék nem sérülnek, továbbá a szemcseátmérő-eloszlás szűk, és az átlagos szemcseátmérőnél sokkal kisebb szemcséket a töltés előtt eltávolították. A mozgófázis áramlása ezekben az egymással összeköttetésben lévő pórusokban történik, míg a visszatartást a vázban lévő mezopórusok adják meg. Az áramlást lehetővé tevő pórusok átmérője  $1\text{--}3 \mu\text{m}$ , a visszatartást eredményező mezopórusok átlagos átmérője pedig  $10\text{--}20 \text{ nm}$  között van, a kereskedelmi forgalomban lévőé  $13 \text{ nm}$ . Utóbbi töltetnek a fajlagos felülete nagyobb, mint  $100 \text{ m}^2/\text{g}$ , ami megfelel a szemcsés töltetknél mért értékeknek. Az 1.12. ábrán az is látható, hogy a pórustérfogat (sötétebb rész) aránya nagy a vázéhoz (világosabb rész) képest (kis fázisarány). Mivel a monolit kolonna porozitása – amely megszabja a kolonna áramlási ellenállását (permeabilitását) – sokkal nagyobb, mint a szemcsés töltetű kolonnaké, ezért ugyanolyan térfogatáramlási sebességhez sokkal kisebb nyomásesés tartozik. Ez a megállapítás igaz mind a szilikagél,

mind a szerves polimer alapú monolitokra. Az első monolitok 100 mm hosszúak voltak, melyeket nagy áramlási sebesség mellett használtak az elemzési idő csökkentése érdekében, viszont ezek nem feleltek meg a folyadékkromatográf-tömegspektrométer (LC-MS) csatolt technika által támasztott követelményeknek. Ez vezetett el végül is az ultragyors monolit kialakításához. Először a kolonna hosszát csökkentették 50, 25 mm-re, majd a belső átmérőjét 4,6 mm-ről 3, majd 2 mm-re. Az 50 mm hosszú 2 mm átmérőjű monolit kolonna (Chromolith FastGradient) jól alkalmazható LC-MS módszerekhez, illetve UHPLC-készülékekben gyors és hatékony elválasztások megvalósítására. Az egybefüggő és közel azonos átmérőjű pórusok a kolonna permeabilitását nagymértékben növelik, így elméletileg is érvényes a klasszikus Kozeny–Carman-összefüggés:

$$K = \frac{\varepsilon^3}{100(1-\varepsilon)} d_p^2, \quad (1.27)$$

ahol  $K$  jelenti a kolonna permeabilitását,  $\varepsilon$  a porozitást, és  $d_p$  a szemcsés töltetű kolonnáknál a szemcseátmérőt, mint karakterisztikus paramétert (*domain size*), a monolit kolonnáknál pedig az áramlást biztosító pórusok átmérőjének és a szilárd fázis vastagságának az összegét. A kolonna porozitását a hagyományos módon tudjuk értékelni, nevezetesen a kolonnán belül található üres térfogat és a kolonna összes térfogatának hányadosaként. A permeabilitás és a kolonnán létrejövő nyomásesés között a következő összefüggés teremt függvénykapcsolatot:

$$K = \frac{u \cdot \eta \cdot L}{\Delta p}, \quad (1.28)$$

ahol  $\eta$  a mozgófázis viszkozitását jelenti. Átrendezve az egyenletet,  $\Delta p$ -re a következő összefüggést kapjuk:

$$\Delta p = \frac{u \cdot \eta \cdot L}{K}. \quad (1.29)$$

Tehát a kolonna áramlási ellenállása (permeabilitása) közvetlenül megszabja a kolonnán a nyomásesést, ez viszont a kolonna porozitásával függ össze. Szilikagél alapú monolit kolonnáknál a teljes porozitás  $\varepsilon = 81\%$ .<sup>38</sup> Szemcsés kolonnáknál, amelyeket a hagyományos HPLC- és UHPLC-technikánál használunk, ez az érték 50-70% ugyan, de az áramlási csatornákat adó szemcsék közötti porozitás kisebb, mint 40%, melyhez hozzájárul a nem egyenletes csatornaátmérő, aminek következtében a  $K$  értéke tovább csökken. Bevezethetjük a  $\phi$  paramétert, amely az áramlási ellenállással arányos tényező:

$$\phi = \frac{d_p^2}{K} = \frac{d_{\text{dom}}^2}{K} . \quad (1.30)$$

Az összefüggés egyértelmű függvénykapcsolatot ad a karakterisztikus méret (szemcseméret vagy domain méret,  $d_{\text{dom}}$ ) és az áramlási ellenállás, valamint a karakterisztikus méret és a  $\phi$  között. A monolit kolonnánál, ahol az átfolyópórus- és a vázátmérő viszonya közel állandó, a  $\phi$  értéke is állandó; összevetve egy 5  $\mu\text{m}$  átlagos szemcseátmérőjű kolonnával, annál közel egy nagyságrenddel kisebb, tehát az áramlási ellenállás kevésbé szab határt az elemzések gyorsításának. Ha figyelembe vesszük a kolonna által elért tányérszámot, a retenciós időt, és a létrejövő nyomásesést (azaz a permeabilitást), akkor a kolonna abszolút teljesítménye az (1.16) egyenlet szerint az elválasztási ellenállással ( $E$ ) definiálható.

A monolit kolonnák elméletileg jó lehetőséget adnak a gyors elválasztásokra, az elválasztási ellenállásuk igen kedvező – sok esetben jobb, mint a szemcsés tölteteké –, a gyakorlatban azonban a technikai problémák miatt az elméletinél kisebb hatékonyságot lehet velük elérni. A nemrég megjelent második generációs monolit töltetek ezt a hátrányt részben kiküszöbölik, mivel itt az átfolyó pórusok egyenletességének növelésével nagyobb kinetikai hatékonyságot tudtak elérni. A második generációs monolit porozitása azonos az első generációséval, viszont az átfolyó pórusok és a falvastagság valamivel kisebbek, mint az elődjénél voltak, aminek természetes következménye az áramlási ellenállás növekedése. Azonos dimenziójú második generációs kolonnán – azonos térfogat áram mellett – kb. kétszer nagyobb nyomás esik, mint egy első generációs monoliton. A szilikagél alapú monolit kolonnák műanyag [poli(éter-éter-keton), PEEK] házban kerülnek forgalomba, ez pedig behatárolja az alkalmazható felső nyomást, amely általában 200 bar.

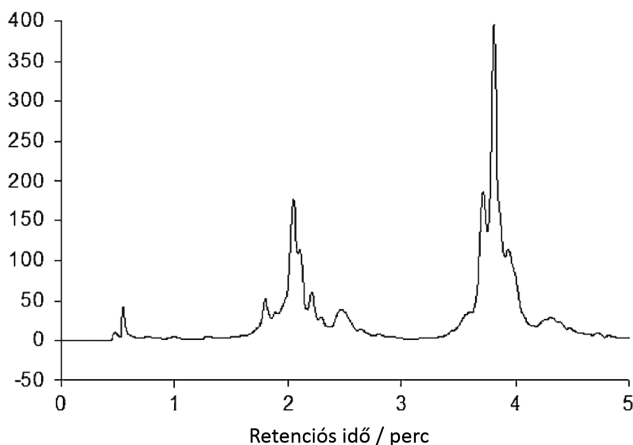
Meg kell említenünk néhány szóban a szerves polimer alapú [polimetakrilát, poliakrilamid, poli(sztírol-divinilbenzol)] monolitokat is, amelyeket elsősorban makromolekulák (fehérjék, peptidek, oligonukleotidok) elválasztására alkalmaznak sikeresen.<sup>39-44</sup> Elsősorban jó pH- és hőstabilitásuk, valamint a szilanolcsoportok hiányából eredő – káros másodlagos kölcsönhatásokat, ioncserére való hajlamot kizáró – kedvező tulajdonságaik miatt terjedtek el a fehérjeanalitikában. Kereskedelmi forgalomban a Thermo Scientific cég ProSwift név alatt megjelent kolonnái (RP-1S, RP-2H, RP-3U és RP-10R) kaphatók, melyek nagy előnye, hogy a fehérjék kevésbé adszorbeálódnak a szerves polimer alapú állófázisaikon, ezért jobb visszanyeréssel dolgozhatunk, mint a szilikagél alapúakon.<sup>45</sup> Hátrányuk viszont, hogy a mezopórusos szerkezet

hiánya miatt a felbontó erejük és terhelhetőségük lényegesen kisebb, mint a szilikagél alapú monolitoké. Az 1.3. táblázatban a 2014-ig kereskedelmi forgalomban került monolit kolonnákat foglaltuk össze.

1.3. táblázat. Kereskedelmi forgalomban (2014-ig) megjelent monolit kolonnák

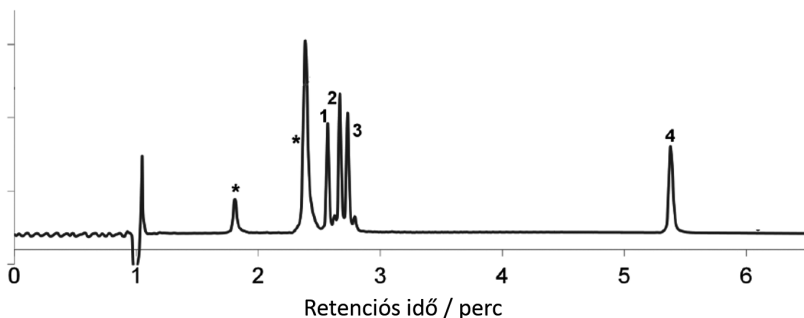
gyártó	kolonnatöltet neve	átfolyó pórus /μm	mezopórus /nm
Merck	Chromolith	1,9	12
	Chromolith 2nd generation	1,2	14
Phenomenex	Onyx	1,9	12
	Proswift RP-1S	1,0	-
Thermo Scientific	Proswift RP-2H	2,2	-
	Proswift RP-3U	5,1	-
	Proswift RP-10R	nem ismert	-

A fehérjeanalitikában nagy áttörést jelenthetnének a nagy (pl. 20-30 nm) pórusú szilikagél alapú monolitok. Kísérleti fázisban már léteznek 26 nm-es mezopórusúval rendelkező második generációs szilika monolitok, és valóban jól teljesítenek a peptid- és fehérjeelválasztások területén.<sup>46</sup> Jelenleg a kismolekulás gyógyszer-analitikában ugyanakkor a szilikagél alapú monolitok nem terjedtek el, itt a teljesen porózus és héjszerkezetű töltetek uralkodnak.



1.13. ábra. Hőterhelt, redukált, majd papainnal emésztett IgG1 típusú monoklonális antitest (rituximab) kromatogramja. Kolonna: ProSwift RP-1S (szerves polimer alapú monolit), mozgófázis: acetonitril-víz (+ 0,1% trifluoecetsav) gradiens, kolonnahőmérséklet: 70 °C, lineáris áramlási sebesség: 5,8 cm/perc, detektálás: fluoreszcens emisszió (gerjesztés: 280 nm, emisszió: 360 nm)

Fehérjeanalitikában a fordított fázisú elválasztásokra viszont gyakran alkalmaznak szerves polimer alapú monolitokat. Az 1.13. ábrán egy hőterhelésnek kitett, redukált, majd papainnal emésztett IgG1 típusú monoklonális antitest kromatogramját mutatjuk be.<sup>47</sup> Az 1.14. ábra pedig négy különböző inzulin és két konzerválószer készítményből történő gyors elválasztását szemlélteti nagy pórusú második generációs szilikagél alapú monoliton.



1.14. ábra. Inzulinok (1-4) és konzerváló segédanyagok (\*) gyors elválasztása második generációs nagy pórusú szilikagél alapú monoliton (kísérleti minta, jelenleg nem kapható kereskedelmi forgalomban). Kolonna: 100 × 4,6 mm, mozgófázis „A”: 0,1% trifluoecetsav vízben, mozgófázis „B”: 0,1% trifluoecetsav acetonitrilben. Gradiens program: 25% B-60% B 6 perc alatt. Térfogatáram: 1,5 mL/perc; kolonnahőmérséklet: 45 °C; injektált térfogat: 5 µL, detektálás: UV 210 nm

#### 1.2.2.4. Szemcsés, teljesen porózus, héjszerkezetű és monolit kolonnák összehasonlítása

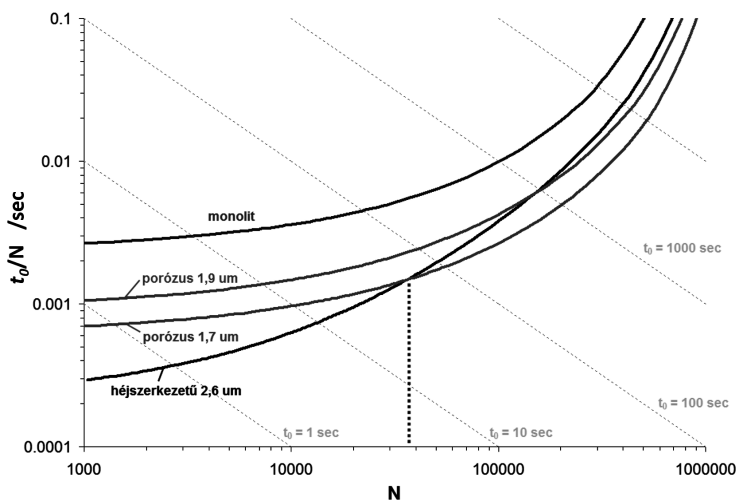
A gyakorlatban általában arra vagyunk kíváncsiak, hogy melyik kolonna adja a leggyorsabb vagy a legnagyobb hatékonyságú elválasztást. Eddig szó esett a van Deemter-típusú (*H-u*) görbékről, amelyek megmutatják, hogy adott kolonnával milyen elméleti tányérmagasság érhető el egy adott lineáris sebesség- (vagy mozgófázis-térfogatáram-) tartományban. Ezekkel a görbékkel összehasonlíthatjuk a különböző kolonnákat aszerint, hogy melyik kolonna ad jobb tányérszámot egy adott lineáris sebességnél. Viszont ezek a *H-u* görbék nem adnak tájékoztatást arról, hogy egy adott elválasztás mennyi időt igényel, illetve hogy mi is az a maximális tányérszám vagy leggyorsabb elválasztás, ami megvalósítható az adott kolonnával. Ahhoz, hogy ilyen következtetéseket vonjunk le, figyelembe kell vennünk a kolonnák permeabilitását, mechanikai stabilitását (nyomásállóságát), illetve készülékünk maximális működtetési nyomását. Másik nehézség a



$H$ - $u$  görbékkel a különböző morfológiájú töltetek összehasonlítása, hiszen a karakterisztikus tulajdonságok eltérőek egy monolitnál, egy teljesen porózus, vagy egy héjszerkezetű szemcsés töltetnél.

A kinetikus görbék módszerével – a kísérletileg felvett  $H$ - $u$  adatokat felhasználva – egyszerűen elvégezhetjük az analízisidő és a tányérszámok „extrapolálását” egy adott (pl. maximális) nyomásértékre, így megtudhatjuk, hogy mekkora a maximálisan elérhető tányérszám adott analízisidőn belül, illetve hogy mi a legrövidebb idő egy adott tányérszám megvalósítására. Ehhez először kísérletileg meg kell határoznunk a kolonna permeabilitását [ $K$ , ld. (1.27) egyenlet], majd – a mozgófázis viszkozitásának ismeretében – egy adott nyomásesésre ( $\Delta p_{\max}$ ) egyszerűen kiszámolhatjuk  $t_0$  (holtidő), illetve  $N$  (tányérszám) értékét (extrapolált) az (1.17) és (1.18) összefüggésekből. A kapott adatokat többféleképpen is ábrázolhatjuk. Leggyakrabban a  $t_0$ ,  $t_0/N$  vagy  $t_0/N^2$  értékeket szoktuk megjeleníteni a tányérszám függvényében, melyek mindhárman arányosak az analízisidővel. Továbbá az adott tányérszámhoz tartozó kolonnahossz is meghatározható, hiszen kísérletileg megmértük a  $H$  értékeket, és kiszámoltuk a maximális nyomáshoz tartozó tányérszámot, a kettő szorzata tehát megadja azt a kolonnahosszat, amivel az adott tányérszám elérhető. A kinetikus elmélet további részleteit nem tárgyaljuk, azokról számos közleményben olvashatunk.<sup>48</sup>

Ha a kinetikus görbék módszerével összehasonlítjuk a jelenlegi leghatékonyabb, különböző morfológiájú tölteteket, érdekes következtetéseket vonhatunk le. A következő példában 50 mm-es kolonnák kinetikai



1.15. ábra. Összehasonlító kinetikus görbék eltérő szerkezetű (monolit, 1,7 és 1,9  $\mu\text{m}$ -es teljesen porózus, és 2,6  $\mu\text{m}$ -es héjszerkezetű) töltetekre



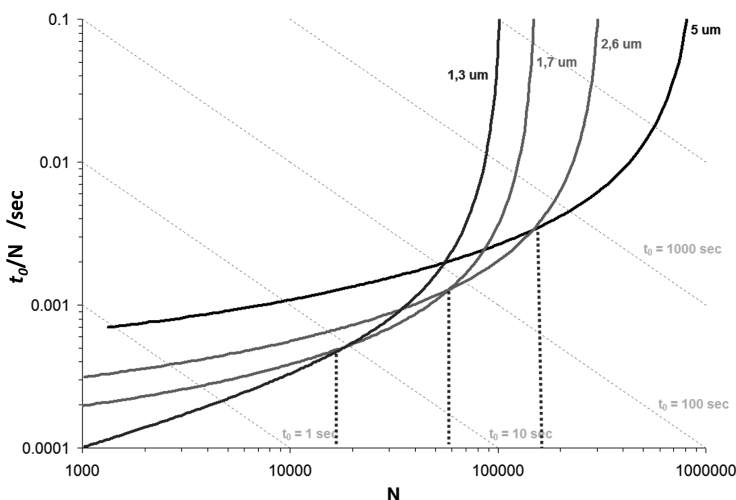
tulajdonságát hasonlítottuk össze kis gyógyszermolekulák elválasztására (monolit, teljesen porózus 2  $\mu\text{m}$  alatti, illetve héjszerkezetű 2,6  $\mu\text{m}$ -es töltetek; 1.15. ábra).<sup>47</sup>

Korábban részleteztük, hogy az adott töltettípusokkal milyen tényérszámok várhatók, illetve említést tettünk a kolonnák permeabilitásáról (áramlási ellenállásáról). Jelenleg a legjobb tényérszámok, a legnagyobb kinetikai hatékonyság, a 2  $\mu\text{m}$  alatti teljesen porózus, illetve a 2,6-2,7  $\mu\text{m}$ -es héjszerkezetű, valamint legújabban a 2  $\mu\text{m}$  alatti héjszerkezetű töltetekkel érhető el. A 2  $\mu\text{m}$  alatti teljesen porózus és a 2,6-2,7  $\mu\text{m}$ -es héjszerkezetű töltetekkel nagyjából azonos tényérszámokat tudunk megvalósítani, viszont az utóbbiakkal fele vagy harmad akkora nyomáson tudunk dolgozni, mint az előbbiekkal. A jelenleg kereskedelmi forgalomban kapható monolitoknak rendkívül kedvező a permeabilitása, viszont az elérhető tényérszámok jóval elmaradnak az előző két szemcsés töltetéhez képest. Figyelembe kell vennünk a kolonnák mechanikai stabilitását is. A szilikagél alapú monolitoknak általában 200 bar, a 2,6-2,7  $\mu\text{m}$ -es héjszerkezetű tölteteknek 600-1000 bar, és a 2  $\mu\text{m}$  alatti teljesen porózus tölteteknek pedig 800-1200 bar a nyomásállósága. Az említett tulajdonságokat együttesen szemlélteti az 1.15. ábra, melyen az elválasztás gyorsaságát ( $t_0/N$ ) ábrázoltuk az elválasztáshoz szükséges tényérszám függvényében. Az ábrán a kis  $t_0/N$ , illetve az alacsony  $N$  szakasz ( $N < 10.000-30.000$ ) felel meg a gyors elválasztásoknak (viszonylag kis tényérszám és rövid analízisidő), ebben a tartományban (az ábra bal alsó negyede) azt látjuk, hogy adott tényérszám (pl.  $N = 20.000$ ) leggyorsabban a 2,6  $\mu\text{m}$ -es héjszerkezetű (Kinetex) töltettel valósítható meg – a gyakorlatban is általában ez az a tartomány, melyen belül dolgozni szoktunk. Kicsit elmarad ettől a teljesen porózus 1,7  $\mu\text{m}$ -es Acquity BEH, majd az 1,9  $\mu\text{m}$ -es Hypersil Gold következik, végül pedig a monolit kolonnával (Chromolith) kapjuk a leghosszabb idejű elválasztást. eltérő rangsort kapunk a nagyfelbontású elválasztások tartományában (az ábra jobb oldali fele). Ha az elválasztás tényérszámigénye  $N = 200.000$ , akkor a teljesen porózus 1,7  $\mu\text{m}$ -es töltet biztosítja a leggyorsabb elválasztást, és ettől valamelyest elmarad az 1,9  $\mu\text{m}$ -es porózus, illetve a héjszerkezetű töltet. Jelenleg a szilika alapú monolitok teljesítménye elmarad a korszerű töltetes kolonnákétól, aminek az egyik oka az, hogy a megengedhető maximális nyomás – melyen ezeket a monolitokat üzemeltetni tudjuk – 200 bar, szemben a töltetes kolonnák nyomásállóságával, ami jelenleg  $p = 600-1200$  bar között van.

Azonos típusú (morfológiájú) töltetnél érdemes összevetni a szemcse-átmérő hatását is. Elméletileg és gyakorlatilag is igazolható, hogy a kisebb

szemcsék a gyors elválasztásokra előnyösebbek, míg a nagyobb szemcse-  
 átmérő főleg a nagyfelbontású elválasztásokra nézve kedvezőbb, hiszen  
 minél kisebb a szemcseátmérő, annál nagyobb tányérszám várható. Tehát  
 rövid kolonnákkal pl.  $N = 10.000-20.000$  tányérszámot el lehet érni 0,5-1  
 perc alatt is (pl. 3 vagy 5 cm-es kolonnával), de mivel egy kis szemcséssel  
 töltött kolonnának a permeabilitása kicsi, ezért nem tudunk hosszú kolonnát  
 alkalmazni, hiszen a készülék vagy a töltet nyomásállósága határt szab  
 ennek. Ilymódon igazán nagy felbontás (pl.  $N = 100.000$ ) nem is érhető  
 el egy kis permeabilitású töltettel, a nagyobb szemcseátmérőjű töltetek  
 permeabilitása viszont lényegesen nagyobb, tehát nagy kolonnahossz is  
 alkalmazható. Mivel a tányérszám arányos a kolonnahosszal, ezért valóban  
 nagy kinetikai hatékonyság érhető el, de hosszú kolonnákat alkalmazva  
 nyilván az elválasztás időigénye is meg fog nőni.

A következő példában 1,3, 1,7, 2,6 és 5  $\mu\text{m}$ -es héjszerkezetű tölteteket  
 hasonlítunk össze a kinetikus görbék módszerével. Az 1.16. ábráról  
 leolvasható, hogy az 1,3  $\mu\text{m}$ -es töltet adja a leggyorsabb elválasztást, ha  
 a mérés tányérszámigénye  $N < 18.000$ , ezzel szemben  $N = 18.000-60.000$   
 között már az 1,7  $\mu\text{m}$ -es szemcse biztosítja a leggyorsabb elválasztás  
 lehetőségét. Ha nagyobb tányérszámokra van szükség, akkor a 2,6  $\mu\text{m}$ -es  
 töltet a legjobb választás, illetve ha extrém tányérszámokra ( $N > 170.000$ ),  
 azaz nagy felbontású elválasztásokra van igény, akkor pedig az 5  $\mu\text{m}$ -es  
 töltetet érdemes használni.



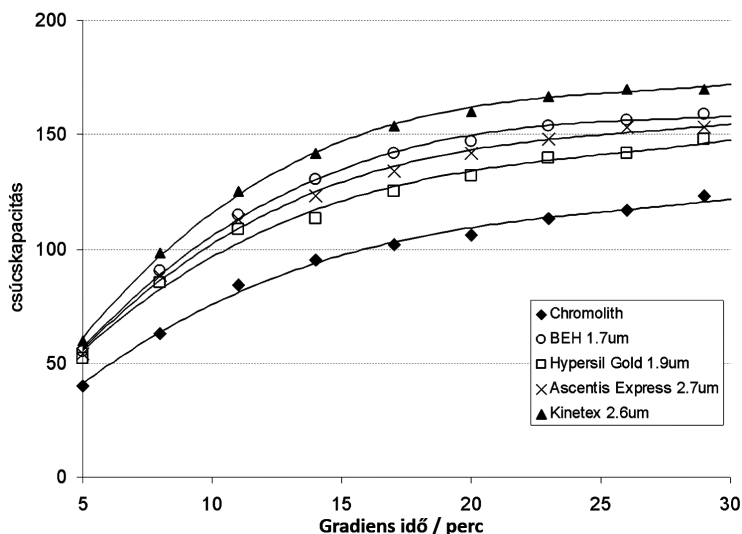
1.16. ábra. Összehasonlító kinetikus görbék azonos szerkezetű, különböző  
 szemcseátmérőjű (1,3, 1,7, 2,6 és 5  $\mu\text{m}$ -es héjszerkezetű) töltetekre

A példák jól rámutatnak arra, hogy az elválasztás céljának megfelelően kell a kolonnát kiválasztanunk, és nem jelenthetjük ki, hogy melyik kolonna vagy melyik szemcseméret a legjobb. A héjszerkezetű 2,6-2,7  $\mu\text{m}$ -es töltetek ugyanakkor általában jól teljesítenek, így egyaránt alkalmazhatók gyors és nagyfelbontású elválasztásokra.

A gyakorlatban a folyadékromatográfiás elválasztások többségét gradiens elúciós módban végezzük, a gradiens elválasztás hatékonyságát pedig általában a csúcskapacitással jellemezzük. A csúcskapacitás annak a mérőszáma, hogy adott idő (pl. a gradiens program ideje) alatt hány darab csúcsot tudunk egymástól elválasztani egy meghatározott csúcsfelbontással (általában  $R_s = 1$ ). Számos összefüggés található az irodalomban a csúcskapacitás ( $n$ ) leírására, a gyakorlatban általában a gradiens idő ( $t_G$ ) és a csúcshélesség ( $w$ ) hányadosát vesszük alapul:

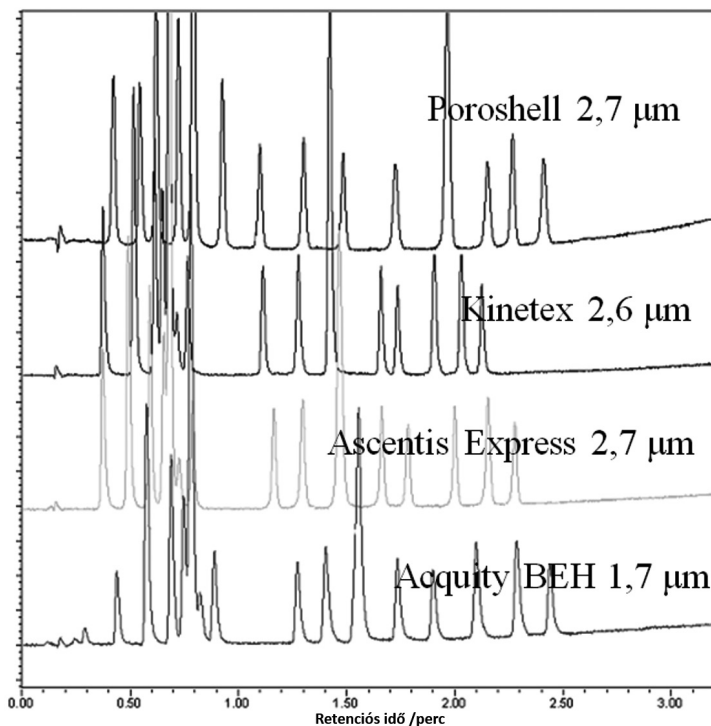
$$n = 1 + \frac{t_G}{w} \quad (1.31)$$

A csúcskapacitás természetesen sok változótól függ, értéke nagymértékben változik a gradiens idővel, a térfogatárammal, a gradiens meredekségével, vagy a mozgófázis hőmérsékletével. A következő példában szintén 50 mm-es kolonnák hatékonyságát hasonlítottuk össze azonos gradiens meredekség, gradiens idő, hőmérséklet és térfogatáram mellett (1.17. ábra).



1.17. ábra. Összehasonlító csúcskapacitás-görbék (monolit, 1,7 és 1,9  $\mu\text{m}$ -es teljesen porózus, ill. 2,6-2,7  $\mu\text{m}$ -es héjszerkezetű töltetek, 50 mm  $\times$  2,1 mm kolonnák); tesztkomponensek: szteroidok

Az 1.17. ábra szerint – az alkalmazott kísérleti körülmények között – a 2,6  $\mu\text{m}$ -es héjszerkezetű Kinetex töltet adja a legnagyobb csúskapacitást, félórás gradiens programmal, 50 mm-es kolonnával akár 170-180 csúcsot is elválaszthatunk egymástól. Kicsit elmarad ettől a két 2  $\mu\text{m}$  alatti és a 2,7  $\mu\text{m}$ -es teljesen porózus töltet, bár még ezekkel is igen nagy csúskapacitás érhető el. Az 50 mm-es monolit kolonnával pedig maximum 110-120 közötti csúskapacitás valósítható meg, ami körülbelül egy 3-4  $\mu\text{m}$ -es teljesen porózus töltet hatékonyságának felel meg.



1.18. ábra. Szteroidok elválasztása 50 mm  $\times$  2,1 mm kolonnákon (3 perc gradiens program, 0,8 mL/perc térfogatáram).<sup>49</sup> Kolonnák: héjszerkezetű Kinetex 2,6  $\mu\text{m}$ , Poroshell 2,7  $\mu\text{m}$ , Ascentis Express 2,7  $\mu\text{m}$  és teljesen porózus Acquity BEH 1,7  $\mu\text{m}$

Hasonlóan az izokratikus elúciós módhoz, gradiens módban is számolhatunk elválasztási ellenállást vagy kinetikus görbékkel, és hasonló eredményt kapunk, mint izokratikus módban. Jelenleg a legígéretesebbnek a 2-3  $\mu\text{m}$  közötti héjszerkezetű töltetek tűnnek, hiszen kiváló kinetikai hatékonyságuk viszonylag nagy kolonnapermeabilitással társul. Nemrégiben kerültek forgalomba 2  $\mu\text{m}$  alatti héjszerkezetű töltetek, amelyek rendkívül nagy kinetikai hatékonyságot mutatnak; példának

okáért egy 50 mm-es, 1,7  $\mu\text{m}$ -es héjszerkezetű töltettel akár  $N = 17.000$ , illetve a legújabb 1,3  $\mu\text{m}$ -es, szintén héjszerkezetű töltettel akár  $N = 20.000$ - $25.000$  tányérszám is elérhető, ami korábban elképzelhetetlen volt.

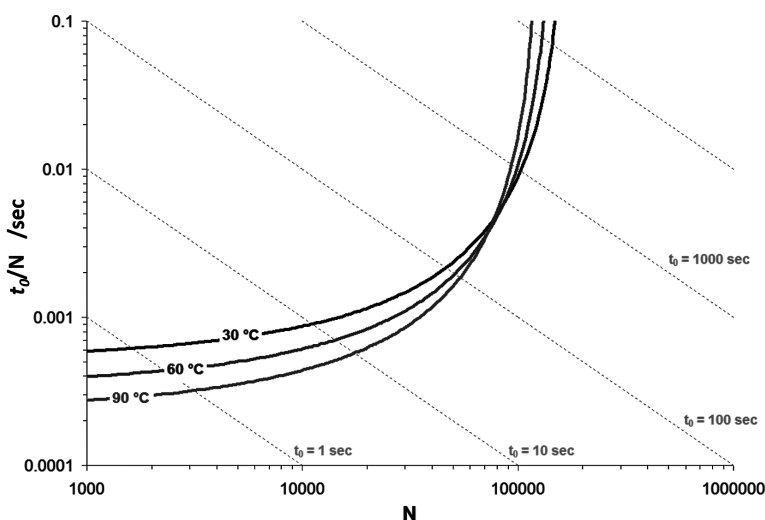
Az 1.18. ábra segítségével gyors gradiens elválasztásokra mutatunk be egy saját példát, melyben korszerű 50 mm-es kolonnákkal 14 szteroidot választottunk el mindössze 2,5 perc alatt.<sup>49</sup> A gyógyszeriparban különösen nagy jelentősége van az elválasztások gyorsításának, hiszen ennek köszönhetően mind a módszerfejlesztési, mind pedig a rutinvizsgálatok ideje drasztikusan csökkenthető. Hagyományos készülékeken, 150-250 mm-es kolonnával (3-5  $\mu\text{m}$ -es töltet) egy hasonló minőségű elválasztás körülbelül 8-15 percet igényelne, szemben a korszerű  $50 \times 2,1$  mm-es kolonnák alkalmazásával, amivel a módszerfejlesztési idő körülbelül harmadára-negyedére csökkenthető.

### 1.2.3. Nagyhőmérsékletű elválasztások

A folyadékkromatográfias elválasztások gyorsíthatók a mozgófázis hőmérsékletének emelésével is, ekkor ugyanis csökken a mozgófázis viszkozitása és nő az anyagátadás sebessége (nő a diffúziós állandó). A  $H$ - $u$  görbék optimuma a nagyobb lineáris sebességek irányába tolódik el, és felszálló águk (a  $C$  tagra jellemző tartomány) meredeksége csökken, ami könnyen belátható az (1.7) egyenletből, hiszen a lineáris sebesség optimuma a diffúziós állandó négyzetgyökével arányos. A csökkent viszkozitás miatt a nyomásesés is kisebb lesz, tehát a lineáris sebességet fokozni tudjuk anélkül, hogy nagy nyomás alkalmazására lenne szükség. Elméletileg tehát nagyon ígéretes a mozgófázis hőmérsékletének emelése. A hőmérséklet előnyös hatását természetesen már nagyon korán felismerték, 1969-ben a technikát HTLC-nek (High Temperature Liquid Chromatography), nagyhőmérsékletű folyadékkromatográfiának nevezték el. Antia és Horváth különösen nagy előnyöket tapasztaltak makromolekulák elválasztásakor.<sup>50</sup> Később, 1995-ben Chen és Horváth fehérjét választottak el 120 °C-os mozgófázis-hőmérsékletet alkalmazva, az elválasztás mindössze 10 másodpercet vett igénybe.<sup>51</sup> Akkoriban ez az eredmény megdöbbentette a kromatográfias világot, senki nem gondolta ugyanis, hogy fehérjét lehet ilyen magas hőmérsékleten vizsgálni, azóta viszont a 70-90 °C-os mozgófázis-hőmérséklet teljesen rutinszerűen használt a fehérjék fordított fázisú elválasztásában. Makromolekulák anyagátadási tulajdonságai

nagymértékben javíthatók a diffúziós sebesség növelésével, a molekulák diffúziós állandóját pedig elsősorban a hőmérséklet szabja meg.

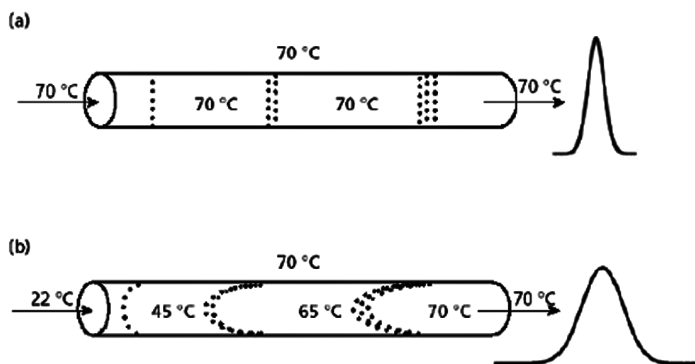
Mivel a kinetikus görbék úgyis tekinthetők, mint egy  $H-u$  adatsor transzformációja, ezért a kinetikus görbék módszerével szemléltetni lehet a hőmérsékletnek az elválasztási időre gyakorolt hatását. A kinetikus görbék megszerkesztéséhez figyelembe kell vennünk a viszkozitás csökkenését is. Az 1.19. ábra egy 1,7  $\mu\text{m}$ -es töltettel 30, 60 és 90 °C-on az elválasztás gyorsaságának ( $t_0/N$ ) várható értékeit mutatja be. Az ábráról egyértelműen leolvasható a várható analízisidő csökkenése (kisebb  $t_0/N$  értékek) a kisebb tányérszám-tartományokban; így például ha  $N = 6000$ , akkor 30 °C-ról 90 °C-ra emelve a hőmérsékletet elvileg kb. felére csökkenthető az analízisidő (utóbbi persze nagyban függ az alkalmazott mozgófázistól, attól, hogy a viszkozitása hogyan változik a hőmérséklettel, illetve hogy a komponensek retenciós tulajdonságai hogyan függnék a hőmérséklettől).



1.19. ábra. A mozgófázis hőmérsékletének hatása az elválasztás gyorsaságára (1,7  $\mu\text{m}$ -es tölteten)

A HTLC-s módszerek egyik kritikus eleme a mozgófázis megfelelő előmelegítése (*pre-heating*), melynek már 60 °C alatt is jelentős a hatása.<sup>52</sup> A nagyhőmérsékletű folyadékkromatográfiában a csúcsalak nagymértékben függ az előfűtött mozgófázis hőmérsékletétől – amelyet a hőcserélő (*pre-heater*) térfogata szab meg –, az adagolt térfogattól és a mintaoldat oldószerétől.<sup>53</sup> Azok a készülékek, amelyek csak az oszlopteret fűtik (lehet statikus vagy dinamikus fűtés, pl. levegőkevertetéssel), általában nem használhatók 60 °C feletti elválasztásokhoz. Az 1.20. ábrán

szemléltetjük a mozgófázis előfűtésének a szerepét. A kolonna után viszont a mozgófázis lehülésére van szükség ahhoz, hogy a káros detektorzajt csökkentsük.<sup>54</sup> A detektorcella termosztálása nélkülözhetetlen, illetve megfelelő hosszúságú összekötő vezetékre van szükség a kolonnakimenet és a detektorcella között a lehülés biztosításához, ami természetesen növeli a kolonnán kívüli térfogatot.



1.20. ábra. Csúcsszélesedés a nagyhőmérsékletű folyadékkromatográfiában mozgófázis-előfűtést alkalmazva (a), illetve csak a kolonnateret fűtve (b)<sup>55</sup>

A nagyhőmérsékletű elválasztások nem nagyon terjedtek el a gyakorlatban, van néhány speciális terület azonban, ahol jól alkalmazhatók. A korlátozott mértékű elterjedésüknek két fő oka van: egyrészt viszonylag kevés hőstabil állófázis kapható kereskedelmi forgalomban, másrészt pedig számolni kell a hőre érzékeny komponensek kolonnán létrejövő lehetséges termikus bomlásával. Az állófázisok szempontjából elsősorban ugyan a cirkónium-oxid alapú töltetek ígéretesek,<sup>56,57</sup> de mivel a retenció tulajdonságaik lényegesen eltérnek a szilikagél alapú töltetektől, ezért a gyógyszeripar még „nem fogadta el” ezt a típust. Néhány szerves polimer és grafit alapú állófázis ugyanakkor igen jó hőstabilitási tulajdonságokat mutat, akár 150-200 °C-ig is alkalmazhatók.<sup>58</sup>

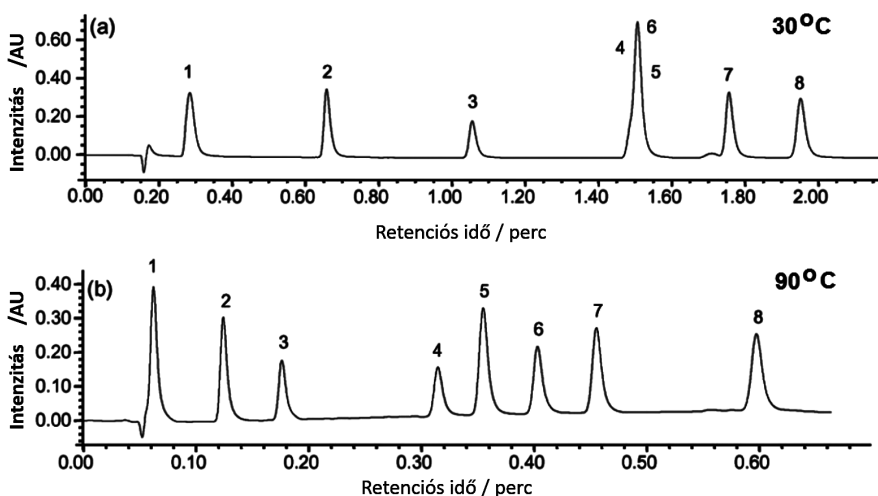
Jelenleg a hőmérséklet adta lehetőségeket elsősorban az elválasztás szelektivitásának módosítására/hangolására aknázzuk ki, nem pedig a módszerek gyorsítására. Az előbbi cél elérése érdekében a mozgófázis hőmérsékletet általában 30-60 °C között szoktuk változtatni. A komponens visszatartásának és a hőmérsékletnek a kapcsolata a következő általános összefüggéssel írható le (van't Hoff-egyenlet):

$$\ln k = -\frac{\Delta H}{RT} + \frac{\Delta S}{R} + \ln \beta, \quad (1.32)$$

ahol  $\Delta H$  a standard entalpiaváltozás,  $R$  az egyetemes gázállandó,  $T$  az abszolút hőmérséklet,  $\Delta S$  a standard entrópiaváltozás,  $\beta$  pedig a fázisarány.

A hőmérséklet emelésével a visszatartás általában csökken. Ha konformációs változás következik be a hőmérséklet-változtatással – főleg peptidok vagy fehérjék vizsgálatakor –, akkor bizonyos esetekben a visszatartás növekedhet, ahogy emeljük a mozgófázis hőmérsékletét (pl. inzulin).

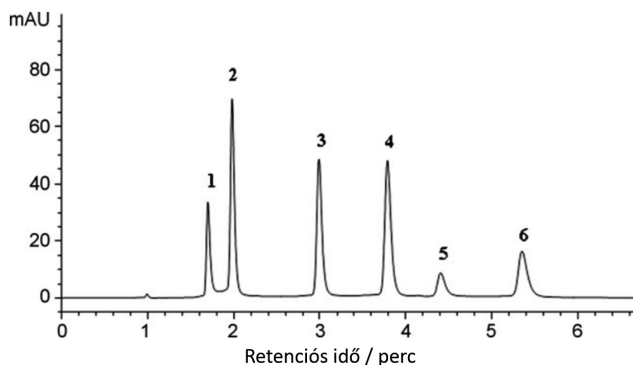
A nem túl nagy hőmérsékletnek (60-90 °C) fontos szerepe lehet a folyadékkromatográfiában, mert általa az UHPLC- és HTLC-technikák előnyeit egyaránt ki tudjuk használni. A kis szemcsés töltetek alkalmazása megemelt hőmérsékleten nagyon ígéretes lehet, hiszen ezzel a viszkozitást csökkentjük, tehát nagyobb térfogatárammal is tudunk dolgozni. Szerencsés esetben a szelektivitás is kedvezően alakulhat a nagyobb hőmérsékleten, ekkor jelentősen csökkenthetjük az elválasztás idejét. Az említettekre mutat egy példát a 1.21. ábra.<sup>59</sup>



1.21. ábra. Kismolekulás gyógyszerhatóanyagok elválasztása 1,7  $\mu\text{m}$ -es tölteten 30, illetve 90 °C-on. Kolonna: Acquity BEH C18 (30  $\times$  2,1 mm), mozgófázis: acetonitril-víz (0,1% hangyasav) gradiens elúció, komponensek: (1) paracetamol, (2) fenazon, (3) fenobarbitál, (4) metilfenobarbitál, (5) propifenazon, (6) nitrazepám, (7) flunitrazepám, (8) diazepám

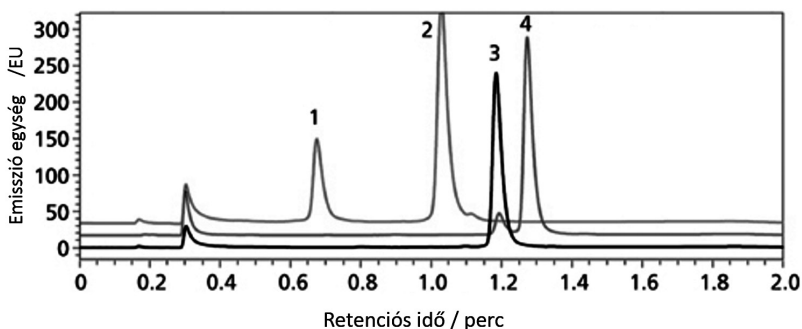
Egy másik gyógyszer-analitikai példában pedig a levonorgesztrell szennyezőinek elválasztását mutatjuk be 150 °C-on (1.22. ábra). A szerzők cirkónium-oxid alapú állófázist és metanol-víz mozgófázist alkalmaztak,<sup>60</sup> melyek segítségével izokratikus módban 6 komponenst választottak el 6 percen belül.





1.22. ábra. Levonorgesztrrel szennyezőinek elválasztása nagy hőmérsékleten ( $T = 150\text{ }^{\circ}\text{C}$ ), cirkónium-oxid alapú állófázison, metanol-víz mozgófázist alkalmazva

A nagyhőmérsékletű kromatográfiának egyik elterjedt alkalmazási területe a fehérjeanalízis, illetve a makromolekulák vizsgálata. Az 1.23. ábrán egy 18,8 kDa tömegű terápiás fehérje (filgrasztim) oxidált és redukált bomlástermékeinek gyors, nagyhőmérsékletű elválasztására mutatunk be egy példát. A szerzők  $80\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on nagy hatékonysággal választották el egymástól a fehérje bomlástermékeit másfél percen belül.<sup>61</sup> Nagypórusú, héjszerkezetű állófázison,  $60\text{--}90\text{ }^{\circ}\text{C}$  hőmérsékletű mozgófázist alkalmazva, nagyméretű fehérjék is keskeny, szimmetrikus csúccsal eluálthatók. Számos tanulmány igazolta, hogy ha az analízisidő megfelelően rövid (tipikusan rövidebb, mint 10-15 perc), akkor nem kell tartanunk a fehérjék oszlopon történő bomlásától.



1.23. ábra. Filgrasztim és bomlástermékeinek elválasztása héjszerkezetű, nagypórusú állófázison (Aeris WP C18,  $50 \times 2,1\text{ mm}$ ),  $80\text{ }^{\circ}\text{C}$  hőmérsékletű mozgófázist alkalmazva. Mozgófázis: acetonitril-víz-0,1% trifluorecetsav gradiens elúció, detektálás: fluoreszcens emisszió (gerjesztés: 280 nm, emisszió: 360 nm).  
Komponensek: oxidált (1, 2), natív (3) és redukált (4) filgrasztim

## 1.3. Módszerfejlesztés a fordított fázisú kromatográfiában

Fordított fázisú folyadékkromatográfiás (RPLC) módszerek fejlesztése a gyógyszermolekulák (API) és szennyezőinek elválasztására összetett feladat, hiszen egyszerre lehet jelen az API-hoz hasonló, illetve attól eltérő szerkezetű szennyező. Mivel a megfelelő kromatográfiás körülmények meghatározása (amit módszerfejlesztésnek nevezünk) sokparaméteres problémának számít, ezért nagy idő- és költségfordítást követel, ennek ellenére mégis sokszor előfordul, hogy a módszert nem lehet egyik laborból a másikba átvinni, vagy éppen nehézséget jelent a kolonnáról-kolonnára történő adaptálás. Ennek leginkább az az oka, hogy a folyadékkromatográfiában a szelektivitást, és ezen keresztül az elválasztást, befolyásoló tényezők kölcsönhatásban állnak egymással.

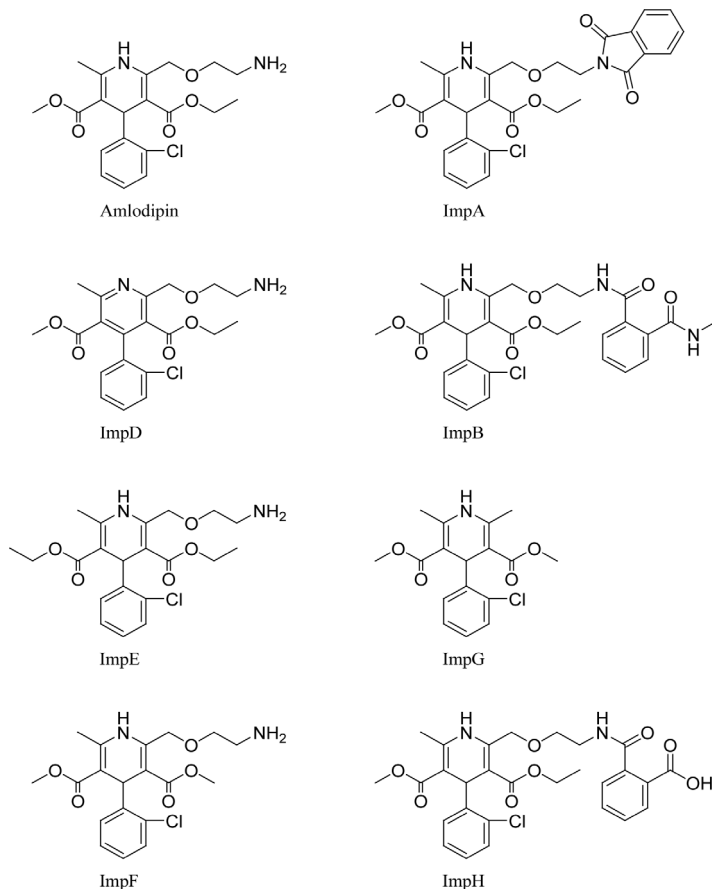
A gyógyszeriparban a szabályozó hatóságok, például az amerikai *Food and Drug Administration* (FDA), irányelveikben újra elővették azt a régi megközelítést, hogy a gyártásnál és a folyamatok ellenőrzésénél minden olyan paramétert, amely az eredményeket befolyásolja, a tudományos ismeretek alapján előre kell jelezni. A fenti megállapítás vonatkozik a gyártást ellenőrző analitikai eljárásokra, így a legtöbbit alkalmazott folyadékkromatográfiás módszerekre is. Ezt a megközelítést nevezik *Quality by Design* (QbD) elvnek.<sup>62</sup> Az előre tervezett kísérleteket nevezi a szakirodalom *Design of Experiment*-nek (DoE), a mérési paramétereket és azok megengedett eltéréseit, amelyeknél a méréseink még teljesítik az általunk megkívánt kromatográfiás paramétereket, nevezzük a mérés terének (*Design Space*, DS). Ebben a pontban azt tárgyaljuk, hogyan lehetséges a jelenlegi ismereteink és a szakértői programok felhasználásával az említett célokat a folyadékkromatográfiás gyakorlatban megvalósítani.

### 1.3.1. A log $D$ meghatározása

Egy folyadékkromatográfiás módszerfejlesztés megkezdésekor az elválasztandó vegyületek három fő anyagi állandóját célszerű meghatározni, ezek a  $pK_a$ , a log  $P$  és a log  $D$ . Ezeket az adatokat vagy az irodalomból kereshetjük ki, vagy pedig számítógépes programokkal (pl. Pallas, ACD, Marvin) kaphatjuk meg.<sup>63-66</sup>

A vizsgálandó komponensek ionizációja befolyásolja a retenciót, a detektálási határokat, a csúcshélesedést, a szelektivitást és a módszer robusztusságát, következésképpen az oldatban jelenlévő komponensek  $pK_a$

értékeinek ismerete fontos a módszerfejlesztési kísérletek tervezésében és kivitelezésében. A  $\log P$  érték a nemionos formában lévő vegyület megoszlását fejezi ki az  $n$ -oktanol/víz fázisok között. Ez az érték arról ad felvilágosítást, hogy az elválasztandó vegyületek hidrophil vagy hidrophób tulajdonságúak-e. Mivel folyadékkromatográfiás körülmények között a komponensek nem csak semleges (nemionos) állapotukban fordulnak elő, ezért módszerfejlesztéskor nagy segítséget nyújt a  $\log D$  értékek ismerete, mely megadja a vegyületek ionos és nemionos formájának megoszlását  $n$ -oktanol/víz fázisok között a pH függvényében.<sup>67</sup>

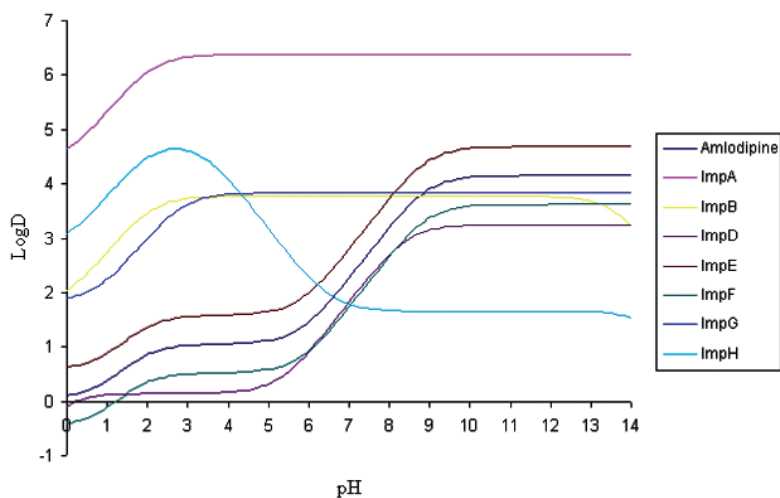


1.24. ábra. Az amlodipin és Ph. Eur. szennyezőinek szerkezete

A  $\log D$ -pH függvény alapján lehet a mozgófázisként használt puffer pH-ját optimalizálni. Ezt a megoszlási hányadost úgy értelmezhetjük az RPLC-ben, hogy az állófázis (C8, C18, fenil stb.) felel meg az  $n$ -oktanolnak, a poláris mozgófázis pedig a víznek. Szem előtt kell tartani azonban, hogy

ez a modell nem veszi figyelembe azokat a kölcsönhatásokat, amelyek kialakulhatnak a vizsgálandó anyagok és az állófázis között, de legalább ad egy „segédmankót” a vizsgálati módszer, illetve a megfelelő álló- és mozgófázis kiválasztásához. A 0 feletti érték azt jelenti, hogy az adott komponens nagyobb mennyiségben van jelen az apolárisabb közegben, tehát várhatunk megfelelő visszatartást fordított fázisú körülmények között.

Az alábbi példában az amlodipin és az Európai Gyógyszerkönyvben (Ph. Eur.) előforduló szennyezőinek kapcsán mutatjuk be a  $\log D$  meghatározását az ACD/LogD program segítségével. Az 1.24. ábrán feltüntetett szerkezetekből látszik, hogy míg az amlodipin, az ImpD, az ImpE és az ImpF bázikus karakterű, mert szabad aminocsoportot tartalmaz, addig az ImpH savas karakterű a karboxilcsoportja miatt. Az ImpA, az ImpB és az ImpG viszont kromatográfiásan semlegesnek tekinthető.

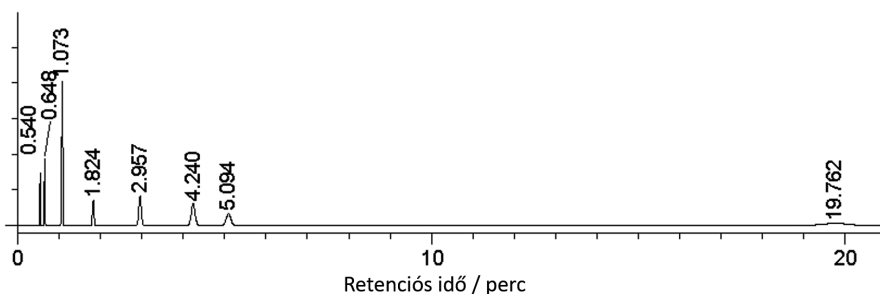


1.25. ábra. Az amlodipin és Ph. Eur. szennyezőinek az ACD/LogD program segítségével meghatározott  $\log D$ -pH függvénye

Az ACD/LogD által szerkesztett  $\log D$ -pH függvény alapján megállapítható (1.25. ábra), hogy mindegyik vegyület  $\log D$  értéke 0 felett van pH = 2 érték felett, tehát RPLC-módszerrel elválaszthatók egymástól, ennek kivitelezésére az 50 mm hosszú, 2,1 mm belső átmérőjű, 1,7  $\mu\text{m}$  átlagos szemcseméretű Acquity BEH C18 állófázist választottuk. A  $\log D$ -pH függvényről leolvasott retenciós sorrend alacsony pH-tartományban: ImpD, ImpF, amlodipin, ImpE, ImpG, ImpB, ImpH és ImpA. A pH emelésével a bázikus csoportot tartalmazó komponensek retenciója nő, míg a savas csoportot tartalmazóé csökken.

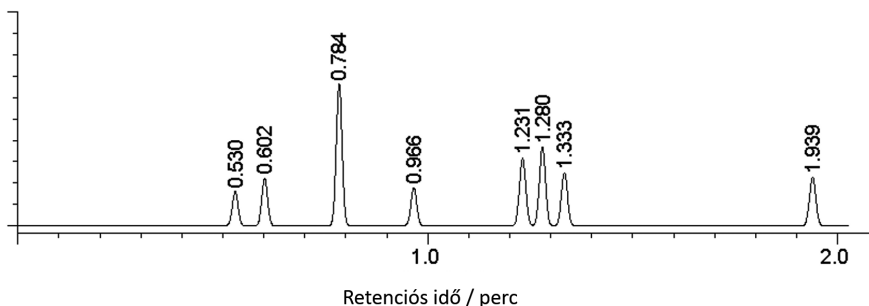
### 1.3.2. Modell alapú kísérlettervezés

A gyógyszeriparban sokszor előfordul, hogy az elválasztani kívánt vegyületek kromatográfiás tulajdonságai nagyon eltérnek egymástól, ilyenkor az izokratikus elválasztás nem lehetséges, mivel ennek megfelelő körülményeket alkalmazva a nagyobb megoszlási hányadosú komponensek nagy retencióval eluálódnak, a retenciós idő növekedésével pedig jelük szélesedik, és szinte beleolvadnak az alapvonalba (1.26. ábra). Az eluens-erősség növelésével viszont a kevésbé visszatartott komponensek között romlik a felbontás, koelúció jöhet létre. A fent említetteket nevezzük általános elúciós problémának.



1.26. ábra. Az amlodipin és Ph. Eur. szennyezőinek elválasztása izokratikus körülmények között. Sorrend: ImpD, ImpF, amlodipin, ImpE, ImpG, ImpB, ImpH, ImpA

A tárgyalt problémára jelenthet megoldást a gradiens elúció alkalmazása (itt csak a lineáris oldószer gradienssel foglalkozunk, mivel gyógyszeripari területen ennek van legnagyobb jelentősége).



1.27. ábra. Az amlodipin és Ph. Eur. szennyezőinek elválasztása gradiens körülmények között. Sorrend: ImpD, ImpF, amlodipin, ImpE, ImpG, ImpB, ImpH, ImpA

A módszer során a mozgófázisban a jobb oldószer (acetonitril, metanol) koncentrációját növeljük, ennek hatására viszont csökken a nagyobb megoszlási hányadossal rendelkező komponensek retenciója. Eltérő kromatográfiás tulajdonságú komponensek esetén a gradiens elúció alkalmazásával jelentősen le tudjuk csökkenteni az elemzési időt, és egyben elérhető, hogy azonos szélességű kromatográfiás csúcsokat kapjunk (1.27. ábra).

A gradiens elúció egy átlagos retenciós tényezővel ( $k_G$ ), gradiens idővel ( $t_G$ ), gradiens meredekséggel ( $b$ ), valamint kiindulási és végső oldószer-koncentrációval jellemezhető:

$$\log k_G = \log k_0 - b \frac{t_G}{t_0}, \quad (1.33)$$

ahol  $k_0$  az induló oldatban mért izokratikus retenciós tényező,  $t_0$  pedig a holtidő.

Kromatográfiásan rokon vegyületek elválasztásánál a gradiens elúció nem okoz sorrendváltást, de a szelektivitás általában csökken, hiszen az állófázis hatásának jelentős részét lecsökkentjük, így tehát csak a kezdeti kötődés mértéke a meghatározó. Kromatográfiásan nem rokon vegyületeknél attól függően, hogy azok hol eluálódnak, retenciós sorrendváltás történhet, a szelektivitás akár csökkenhet, akár nőhet is.

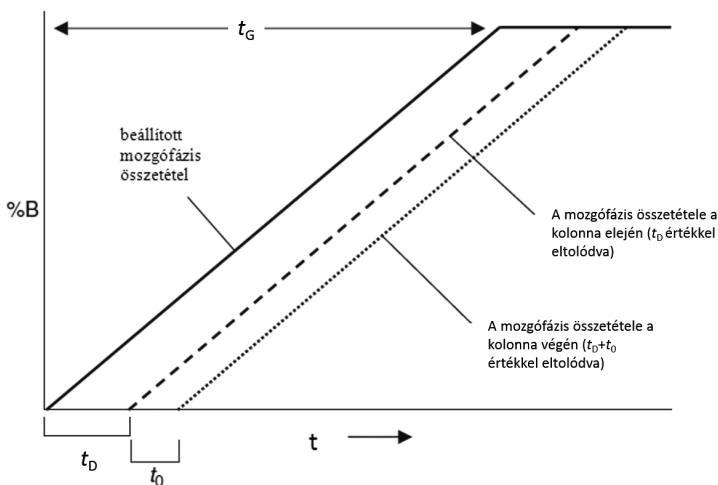
### 1.3.2.1. A DryLab szoftver

A Snyder és munkatársai által elindított kromatográfiás módszer-fejlesztés, amely egydimenziós előrejelzésből indult, eljutott a három dimenzióig (3D).<sup>68-71</sup> A Horváth és munkatársai által kidolgozott szolvofób elmélet,<sup>72,73</sup> mely a retenció mechanizmusát magyarázza az RPLC-ben, nagyban hozzájárult a szimulációs szoftverek fejlődéséhez és robusztus módszerek kidolgozásához, így adva ezzel egy megbízható segítséget a módszerfejlesztésnek. A 3D szimulálással a többes kísérletszám nagymértékben csökkenthető.<sup>74,75</sup>

A DryLab egy széleskörűen használható kísérlettervező szofver az RPLC-ben, melyben egy 3D modell (*kocka*) elkészítéséhez mindössze 12 mérésre van szükségünk,<sup>76</sup> így egyszerre tudjuk kontrollálni a legfontosabb kromatográfiás paramétereket, úgy, mint a gradiens idő ( $t_G$ ), a hőmérséklet ( $T$ ), a pH vagy a terner eluens-összetétel ( $t_C$ ). Ennek megfelelően tehát két típusú kocka ( $t_G$ - $T$ -pH vagy  $t_G$ - $T$ - $t_C$ ) elkészítésére van lehetőségünk.<sup>77</sup>

Mielőtt elkezdenénk a kocka készítését, meg kell ismernünk a készüléket, amellyel dolgozunk. Ehhez meg kell határozni a kolonnán kívüli

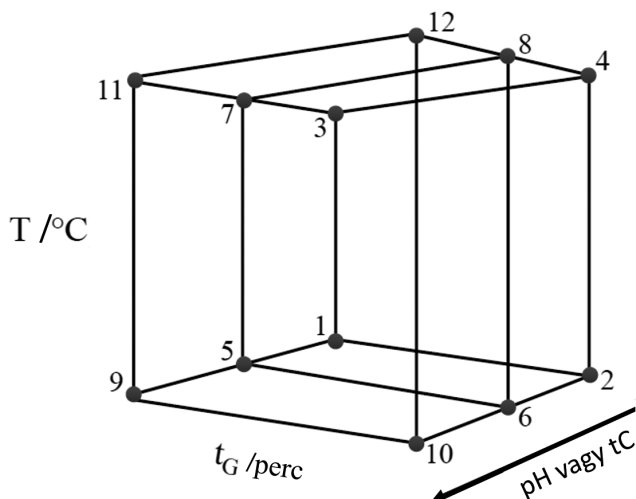
térfogatot, mely az injektor, az összekötő vezetékek és a detektorcella térfogatából tevődik össze. Másik fontos paraméter a késleltetési idő ( $t_D$ ), melynek értelmezése a 1.28. ábrán látható, meghatározására a Ph. Eur.-ban is találunk módszert. A későbbi példákban szereplő készülék egy Acquity UPLC rendszer, melynek rendszertérfogata  $\sim 13 \mu\text{l}$ , a késleltetési ideje pedig  $\sim 0,25$  perc  $0,5 \text{ ml/perc}$  térfogatáramlási sebesség mellett.



1.28. ábra. A késleltetési idő ( $t_D$ ) értelmezése

A kocka felépítését az 1.29. ábra mutatja be. Ez a kísérlettervezés első szakasza, amit a szakirodalom *Design of Experiment*-nek (DoE) nevez.<sup>78,79</sup>

Az 1.29. ábrán a kocka sarkain és élein lévő körök jelzik a mérési pontokat. Az 1, 5, 9, 3, 7 és 11 pontok tartoznak a rövidebb, míg a 2, 6, 10, 4, 8 és 12 pontok a hosszabb  $t_G$ -hez. Az 1, 5, 9, 2, 6 és 10 pontok tartoznak az alacsony, míg a 3, 7, 11, 4, 8 és 12 pontok a magas  $T$ -hez. A három különböző pH-jú mozgófázishoz három különböző ún.  $t_G$ - $T$  sík tartozik, az azonos pH-hoz tartozó  $t_G$ - $T$  síkok a következők: 1, 2, 3 és 4; 5, 6, 7 és 8; 9, 10, 11 és 12. Ha a terner összetételt választjuk harmadik dimenzióként, célszerű úgy eljárni, hogy az első  $t_G$ - $T$  síkhoz (1, 2, 3 és 4) tartozó méréseknél AcN-t választunk, a második  $t_G$ - $T$  síkhoz (5, 6, 7 és 8) tartozó méréseknél AcN:MeOH = 50:50 (V/V)-t választunk, a harmadik  $t_G$ - $T$  síkhoz (9, 10, 11 és 12) tartozó méréseknél pedig MeOH-t választunk szerves módosítónak. A szoftver a 3 mért  $t_G$ - $T$  sík mellé modellez további 97-et. A modellben minden pont egy kromatogramot reprezentál, dimenzióként pedig  $\sim 100$  pont van, ilymódon a kockából  $\sim 10^6$  kromatogram nyerhető ki.



1.29. ábra. A kocka felépítése

A gyakorlatban úgy határozzuk meg a mérési paramétereket, hogy a legkevésbé visszatartott komponens retenciós ideje ( $t_r$ ) legalább a holtidő ( $t_0$ ) kétszerese legyen, vagyis teljesüljön a  $k > 1$  feltétel. További feltétel még, hogy az összes komponens  $t_G$ -n belül eluálódjon mind a 12 kísérletben. Ezeket a feltételeket úgy tudjuk meghatározni, hogy kiválasztjuk az alacsonyabb hőmérsékletet, és itt végzünk néhány kísérletet.

Amennyiben harmadik dimenzióknak a pH-t választottuk, célszerű az alacsonyabb és magasabb pH-n is elvégezni ugyanazokat a kísérleteket, mert a komponensek protonáltsági/deprotonáltsági viszonyai nagymértékben befolyásolják a retenciót. Előfordulhat, hogy egy bázikus csoportot tartalmazó molekula magasabb pH-n még teljesíti a  $k > 1$  feltételt, de a pH csökkentésével megnövekszik az ionizáltsági foka és csökken a retenciója, vagyis már nem teljesíti azt. Fordított értelemben ugyanez mondható el savas csoportot tartalmazó molekuláról, vagyis a pH növelésével növekszik az ionizáltsági fok és csökken a retenció. A fenti szabályokat alkalmazzuk az utolsóként eluálódó komponensekre is, vagyis úgy választjuk meg a pH-t és a gradiens összetételét, hogy az összes komponens eluálódjon. Ha kiválasztottuk a kiindulási pontot (1.29. ábrán az 1-es pont), akkor néhány egyszerű szabály betartásával könnyen meghatározhatjuk a többi kísérleti pontot is. Az első szabály: a hosszabb  $t_G$  háromszorosa legyen a rövidebb  $t_G$ -nek; a második szabály: a két hőmérséklet között 30 °C-nál ne legyen nagyobb különbség; a harmadik szabály:  $\Delta\text{pH} \leq 0,6$  legyen.

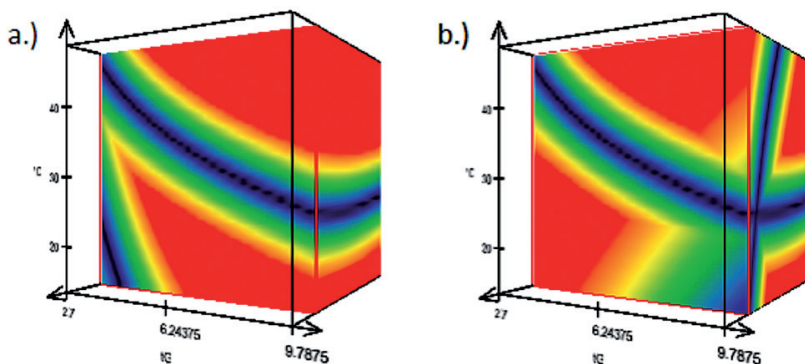
Hasonlóan kell eljárunk, ha harmadik dimenzióknak a terner összetételét ( $t_c$ ) választjuk. Itt az előkísérletek során a pH helyett a szerves módosítóra



kell helyezni a hangsúlyt. A  $k > 1$  feltétel teljesülését AcN-t tartalmazó rendszerben kell biztosítani, mivel az AcN jobb eluens, mint a MeOH, vagyis a komponensek korábban eluálódnak. Ugyanezen ok miatt a gradiens idejét és meredekségét MeOH-t tartalmazó rendszerben kell meghatározni.

### 1.3.2.1.1. A $t_G$ - $T$ -pH 3D modell

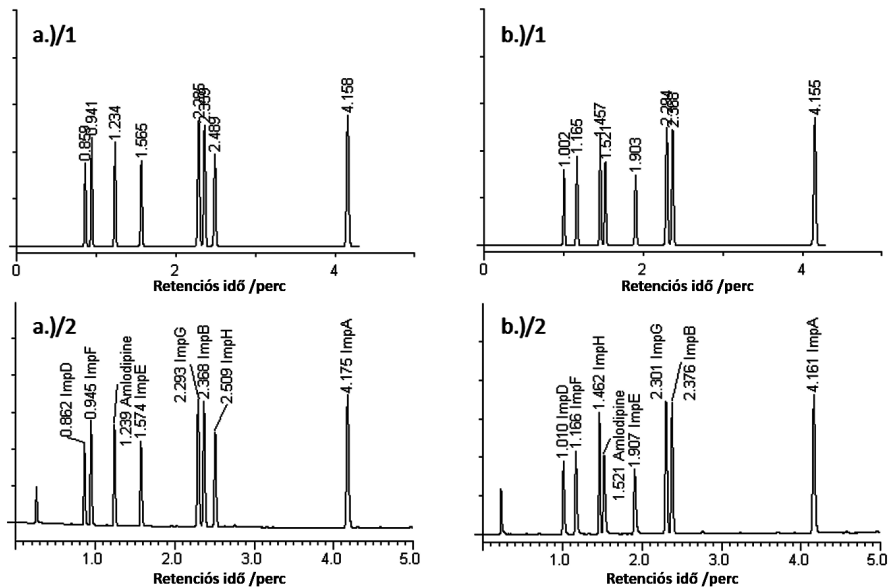
Amennyiben a vizsgálandó molekulák valamelyike rendelkezik protonfunkciós csoporttal, vagyis kromatográfiásan bázikus vagy savas karakterű, pH-kontrollra van szükség. Célszerű a fejlesztést alacsony pH-n kezdeni, mert ott az állófázison lévő szabad szilanolcsoportok disszociálatlan állapotban vannak, így elkerülhetjük a nemkívánt ionos kölcsönhatást az állófázis és a bázikus tulajdonságú vizsgálandó anyag között. Ez a hatás a rövid szénláncú, illetve kevésbé borított fázisokon lehet jelentős.



1.30. ábra. A különböző pH-tartományokhoz tartozó kockák. Az a.) pH = 2,0 → 3,0, míg b.) pH = 7,0 → 8,0 tartományokhoz tartozik. A piros szín (Design Space) jelöli azokat a részeket, ahol az  $R_{s,crit} > 1,5$  feltétel teljesül

Az 1.30. ábrán két pH-tartományban (pH = 2,0 → 3,0 és 7,0 → 8,0) készített kockát látunk. A piros részek jelölik azt a tartományt, ahol a felbontás ( $R_s$ ) értéke nagyobb, mint 1,5 az összes komponensre. Ahogy haladunk a sárga-zöld tartományokon keresztül, egyre csökken az  $R_s$  értéke, a kék tartományban pedig koelúció valósul meg, vagyis két komponens együtt eluálódik. Ha átmegyünk ezen a tartományon, újra elérhetünk egy számunkra előnyös mérési pontot, viszont így két komponens retenciója felcserélődik. A pH-változtatás hatása látszik a két kockából kinyert kromatogramokon is. Alacsonyabb pH-n a savas csoporttal rendelkező

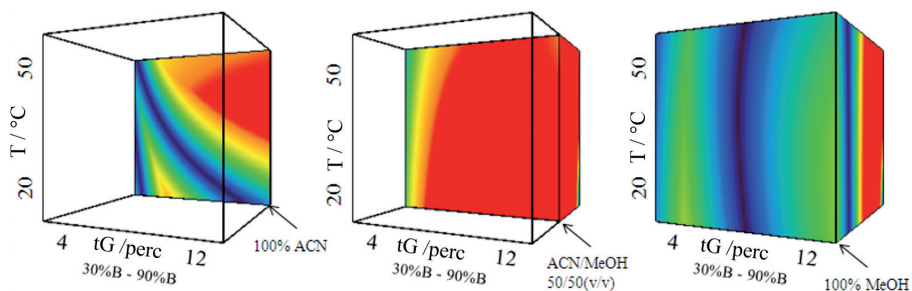
komponens (ImpH) retenciója sokkal nagyobb, mint magasabb pH-n, míg a bázikus csoportot tartalmazó (ImpD, ImpF, amlodipin, ImpE) retenciója nő a pH emelésével. Az 1.31. ábrán a szimulált a.)/1, b.)/1 és a mért a.)/2, b.)/2 kromatogramokból jól megítélhető a „jóslás” hatékonysága.



1.31. ábra. Szimulált a.)/1 és b.)/1, illetve mért a.)/2 és b.)/2 kromatogramok;  $t_G = 5$  min (30% B  $\rightarrow$  90% B),  $T = 40$  °C. Az a.) jelzésű kromatogramok a 2,8-es, a b.) jelzésűek a 7,8-es pH-hoz tartoznak

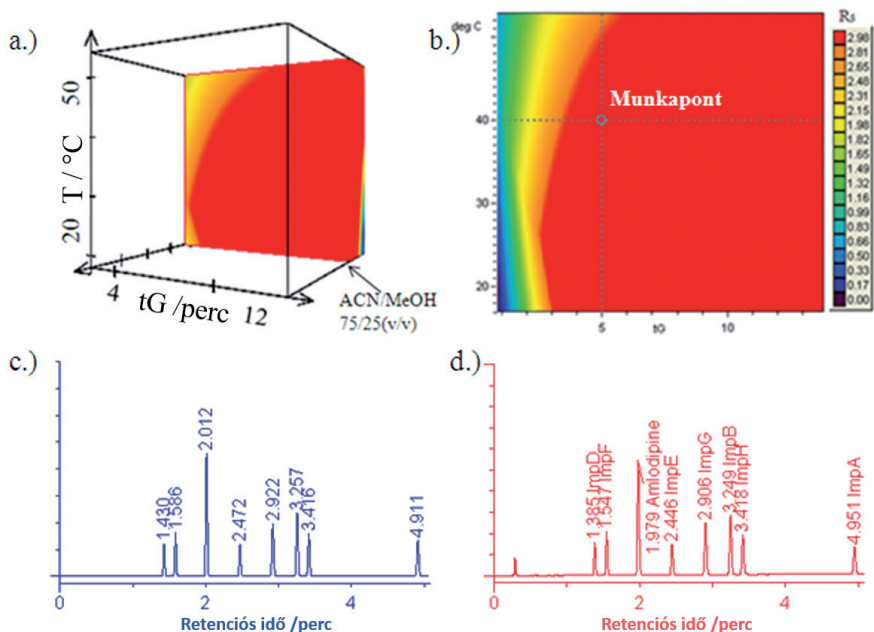
### 1.3.2.1.2. A $t_G$ - $T$ - $t_C$ 3D modell

Az előző modell is jól rámutatott a DryLab szoftver hatékonyságára. Turner összetétel alkalmazásával tovább tudjuk finomítani módszerünket.



1.32. ábra. A  $t_G$ - $T$ - $t_C$  modellhez tartozó síkok

Az 1.32. ábrán egy  $t_G$ - $T$ - $t_C$  modell három  $t_G$ - $T$  síkját látjuk különböző szerves módosítók felhasználásával, amiből egyértelműen látszik, hogy ilyen módon jobb elválasztást érhetünk el.



1.33. ábra. A  $t_G$ - $T$ - $t_C$  modellhez tartozó optimalizált kocka a.),  $t_G$ - $T$  sík b.), szimulált c.) és mért d.) kromatogram

Az 1.33. ábrán egy jól optimalizált modell látható. A szimulált (kék) és mért (piros) kromatogramok itt is nagymértékű egyezést mutatnak.

### 1.3.2.1.3. A szimulált robusztusság vizsgálata

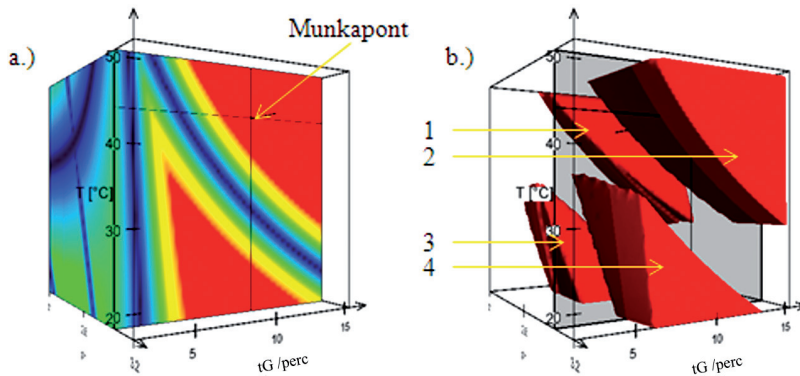
Amódszerfejlesztés korai szakaszában érdemes meggyőződni arról, hogy a fejlesztett módszer mennyire érzékeny a kromatográfiai körülmények változására, vagyis mennyire robusztus. A DryLab szoftver legújabb verziója (DryLab 4) lehetővé teszi a tervezett módszer robusztusság-vizsgálatát, melynek során a gradiens elúcióban leggyakrabban alkalmazott körülmények ( $t_G$ ,  $T$ , pH vagy  $t_C$ , térfogat-áramlási sebesség, induló és végső mozgófázis-összetétel) hatásait tudjuk modellezni.<sup>80</sup>

### 1.3.2.2. A mérés tervezése

Az alábbiakban az amlodipin-bezilát–bizoprolol-fumarát kombinált hatóanyag példáján keresztül mutatjuk be a módszerfejlesztés menetét:

Állófázis:	Acquity CSH C18 50 × 2,1 mm, 1,7 μm
Mozgófázis:	„A”: 30 mM nátrium-foszfát „B”: acetonitril
Áramlási sebesség:	0,5 mL/perc
	$t_{G1} = 3$ perc $t_{G2} = 9$ perc (10% B → 90% B)
DryLab paraméterek:	$T_1 = 20$ °C $T_2 = 50$ °C
	$pH_1 = 2,0$ $pH_2 = 2,6$ $pH_3 = 3,2$

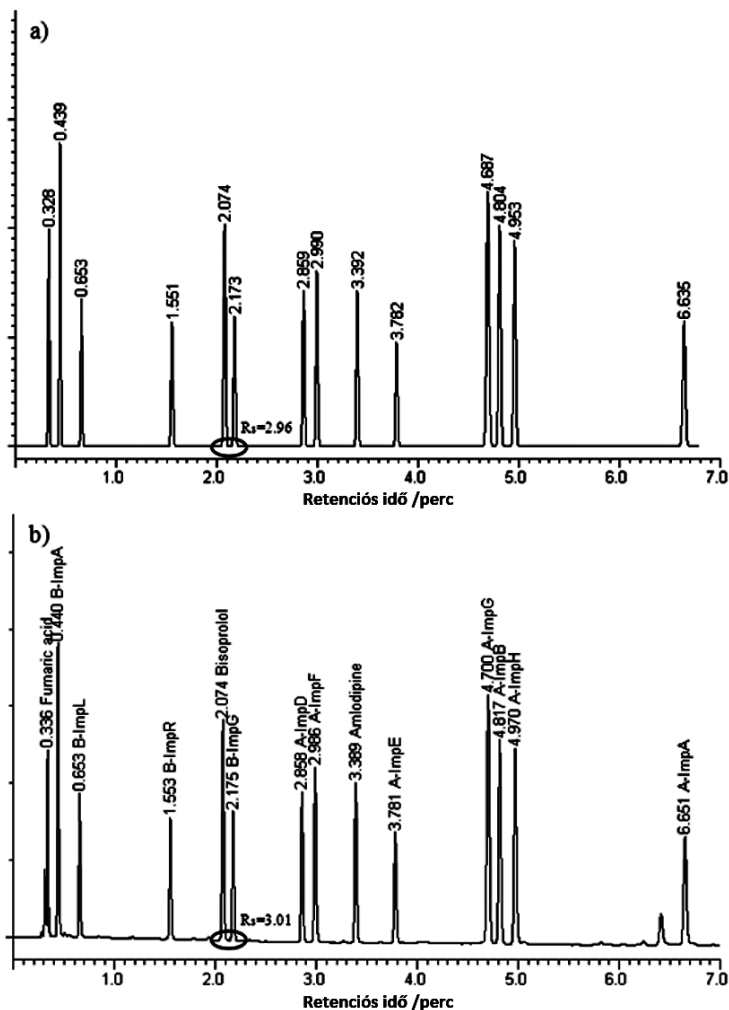
A beállított paraméterekkel végzett 12 kísérletből származó kockát az 1.34. ábrán mutatjuk.



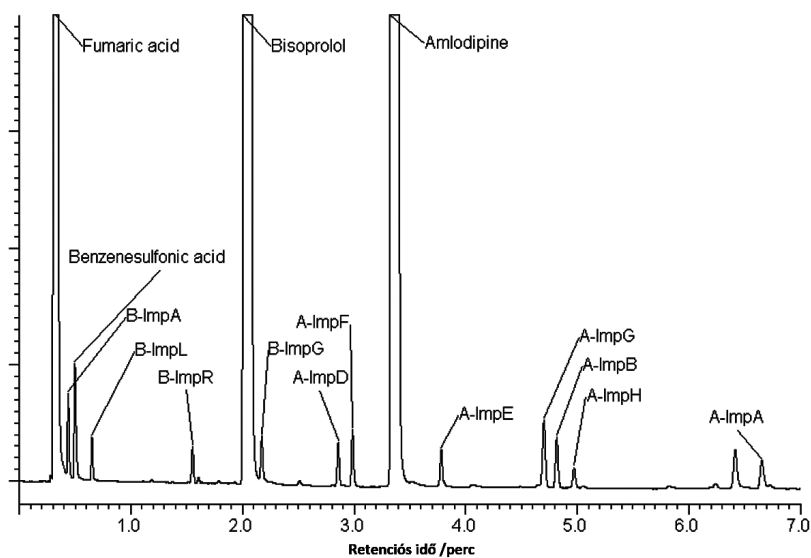
1.34. ábra. Az a.) ábrán a teljes kocka látható a munkaponttal, míg a b.) ábrán csak azok a tartományok vannak feltüntetve (1, 2, 3 és 4), ahol teljesül az  $R_{s,crit} > 1,5$  feltétel

Az 1.34/b. ábrán négy tartomány látható, melyeken belül remény van arra, hogy robusztus körülményeket találjunk. A mintában alacsony pH-n ( $pH < 2,5$ ) a bizoprololhoz tartozó fumársav és a B-ImpA szennyező között nincs megfelelő elválasztás (1.34/b. ábra 1-es és 3-as régiója), magasabb pH-n ( $pH > 2,5$ ) és alacsonyabb hőmérsékleten ( $T < 30$  °C) pedig a bizoprolol és a B-Imp-G között nincs megfelelő felbontás (4-es régió). Az elválasztásra megfelelő tartomány a magasabb pH ( $pH > 2,5$ ) és hőmérséklet ( $T > 40$  °C) értékeihez tartozik (2-es régió). A megfelelő munkapont paraméterei:  $t_G = 10$  perc 10% B → 90% B (meredekség = 8,0% B/perc),  $T = 45$  °C,  $pH = 3,0$ . Az ilyen körülmények között elvégzett

szimuláció eredménye (1.35/a. ábra) és a mért kromatogram (1.35/b. ábra) jó egyezést mutatnak egymással, a szimulált és mért felbontásértékek is nagyon hasonlóak (1.35. ábra). Ebben az esetben a bizoprolol és a B-ImpG között 1,5-nél nagyobb felbontási kritériumot kell előírunk, hiszen a vizsgálandó mintában több nagyságrend (~ 4) különbség lesz a két komponens koncentrációja között. Ilyenkor ajánlatos az  $R_{s,crit} > 2,5$  értéket megcélozni annak érdekében, hogy biztosan elválaszthassuk a hatóanyag után közvetlenül eluálódó komponenst. A szpájkolt (célzottan adalékolt) minta kísérletileg kapott kromatogramja az 1.36. ábrán látható.



1.35. ábra. Az amlodipin-bizoprolol kombinált készítmény szimulált a.) és mért b.) kromatogramja



1.36. ábra. Az amlodipin-bisoprolol kombinált készítmény szpájkolt kromatogramja

A fejlesztett módszer robusztusságvizsgálatának elvégzéséhez be kell állítanunk az elválasztást befolyásoló paraméterek toleranciaszintjét, vagyis azt, hogy mekkora eltérést engedünk meg az eredeti módszerhez képest (1.4. táblázat). A megengedett eltérés mértékét a használt készülék megbízhatóságának függvényében érdemes beállítani.

1.4. táblázat. Kromatográfiai paraméterek és megengedett eltéréseik

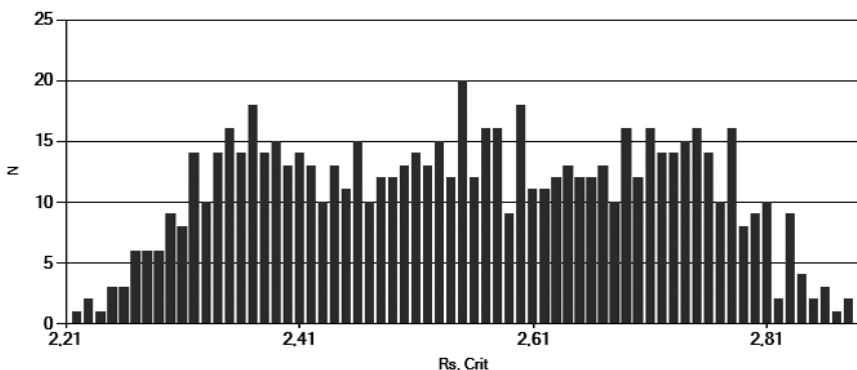
Paraméterek	Értékek	Eltérés
$t_G$ /perc	10,0	$\pm 0,1$
$T$ / $^{\circ}\text{C}$	45	$\pm 1$
pH	3,0	$\pm 0,1$
áramlás / (mL/perc)	0,500	$\pm 0,005$
start % B	10,0	$\pm 0,5$
végző % B	90,0	$\pm 0,5$

A DryLab szoftver robusztusságvizsgáló funkciója a 6 mérési paramétert három szinten (-1, 0, +1) vizsgálja és kombinálja azokat, vagyis  $3^6 = 729$  szimulált mérést végez el. Az 1.5. táblázatban láthatjuk a szimulált és mért  $t_R$ , illetve  $R_{s,crit}$  értékek közötti eltéréseket az eredeti paramétereken ( $t_G = 10,0$  perc,  $T = 45$   $^{\circ}\text{C}$ , pH = 3,0, áramlás = 0,500 ml/perc, start % B = 10,0 és végző % B = 90,0), illetve további három robusztus helyen.

1.5. táblázat. Az eredeti és robusztus paramétereken végzett kísérletek  $t_R$  és  $R_{s,crit}$  szimulált és mért értékei

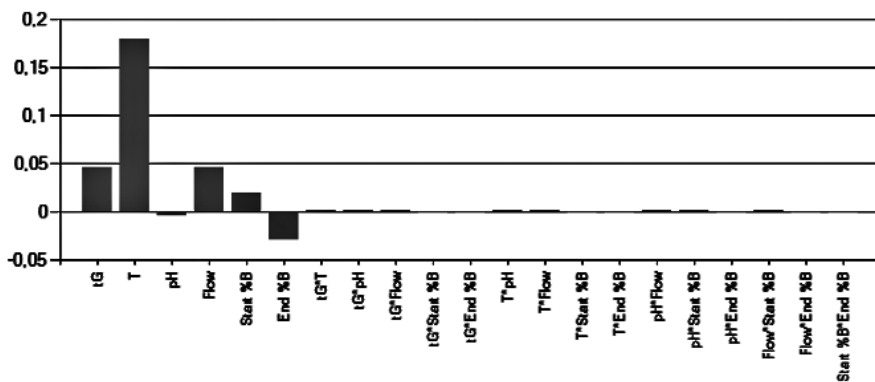
	Eredeti módszer		Minimum $R_{s,crit}$		Alacsony paraméterek		Magas paraméterek	
	Szimulált $t_R$ /perc	Mért $t_R$ /perc	Szimulált $t_R$ /perc	Mért $t_R$ /perc	Szimulált $t_R$ /perc	Mért $t_R$ /perc	Szimulált $t_R$ /perc	Mért $t_R$ /perc
Fumársav	0,33	0,34	0,33	0,34	0,36	0,35	0,30	0,30
B-ImpA	0,44	0,44	0,48	0,48	0,47	0,46	0,41	0,43
B-ImpL	0,65	0,65	0,72	0,71	0,70	0,68	0,60	0,63
B-ImpR	1,55	1,55	1,63	1,63	1,59	1,60	1,51	1,52
Bizoprolol	2,07	2,07	2,15	2,14	2,11	2,11	2,02	2,04
B-ImpG	2,17	2,18	2,25	2,24	2,21	2,21	2,12	2,14
A-ImpD	2,86	2,86	2,93	2,92	2,89	2,89	2,81	2,82
A-ImpF	2,99	2,99	3,05	3,04	3,03	3,02	2,93	2,94
Amlodipin	3,39	3,39	3,45	3,44	3,42	3,42	3,33	3,35
A-ImpE	3,78	3,78	3,84	3,82	3,81	3,81	3,72	3,75
A-ImpG	4,69	4,70	4,72	4,72	4,74	4,76	4,61	4,64
A-ImpB	4,80	4,82	4,83	4,82	4,85	4,86	4,73	4,77
A-ImpH	4,95	4,97	4,97	4,96	5,01	5,03	4,86	4,91
A-ImpA	6,63	6,65	6,65	6,63	6,67	6,69	6,56	6,61
$R_{s,crit}$ A-ImpG - A-ImpB	2,55	2,52	2,22	2,19	2,29	2,29	2,81	2,84

A 729 kísérletből a legkisebb  $R_{s,crit}$  értékekhez tartozó paramétereket ( $t_G = 9,9$  perc,  $T = 44$  °C, pH = 3,1, áramlás = 0,495 ml/perc, start % B = 9,5 és végső % B = 90,5), a -1-hez tartozó paramétereket ( $t_G = 9,9$  perc,  $T = 44$  °C, pH = 2,9, áramlás = 0,495 ml/perc, start % B = 9,5 és végső % B = 89,5) és a +1-hez tartozó paramétereket ( $t_G = 10,1$  perc,  $T = 46$  °C, pH = 3,1, áramlás = 0,505 ml/perc, start % B = 10,5 és végső % B = 90,5) választottuk az összehasonlításhoz. Az 1.37. ábrán látjuk az összes (729)  $R_{s,crit}$  érték eloszlását, amiről leolvasható, hogy minden kísérlet teljesíti a korábban megfogalmazott  $R_{s,crit} > 1,5$  feltételt. Az 1.38. ábra arról ad felvilágosítást, hogy melyik paraméter vagy paraméterkombináció van legnagyobb hatással a felbontásra.



1.37. ábra. A 729 mérés  $R_{s,crit}$  eloszlása, egy négyzet (■) jelképez egy mérési paraméterhez tartozó  $R_{s,crit}$  értéket.  $R_{s,crit,min} = 2,21$ ,  $R_{s,crit,max} = 2,88$

Ebben az esetben a  $T$  a legfőbb befolyásoló tényező, ezt követi a  $t_G$  és az áramlás, a kombinált (más néven kereszt-) hatásoknak kis szerep jut az elválasztásban.



1.38. ábra. A kromatográfiai paraméterek hatása a felbontásra

### 1.3.2.3. Quality by Design a gyógyszer-analitikában

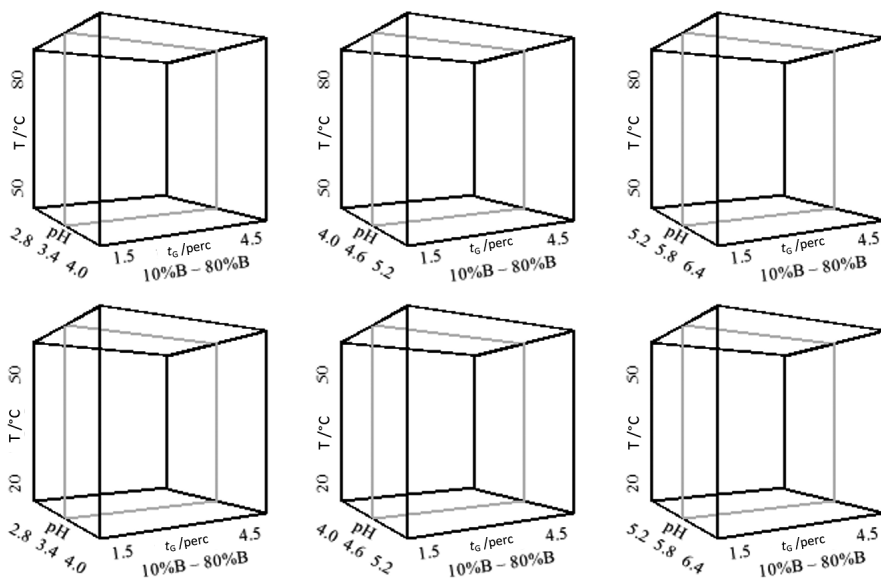
Az alábbiakban egy fejlesztés alatt álló gyógyszermolekula folyadékkromatográfiai módszerfejlesztését mutatjuk be a QbD-elv figyelembe vételével. A termékfejlesztés korai szakaszától követjük a fázistermékek mennyiségét, elemezzük azokat a közti-termékekben és a végtermékekben, vizsgáljuk továbbá a szintézis során keletkező egyéb szennyezőket is. A vizsgált minta (API) két ismert (Imp1 és Imp2), továbbá két ismeretlen (Imp3 és Imp4) szerkezetű szennyezőt tartalmaz a kiindulási anyagok (Stm1 és Stm2) és fázistermékek (Int1-Int7) mellett.



Megjegyezzük, hogy a DryLab szoftverrel történő fejlesztéshez nem kell ismerni a vegyületek szerkezetét, csupán a retenciójukat kell nyomon követnünk a kromatográfiás rendszerben.

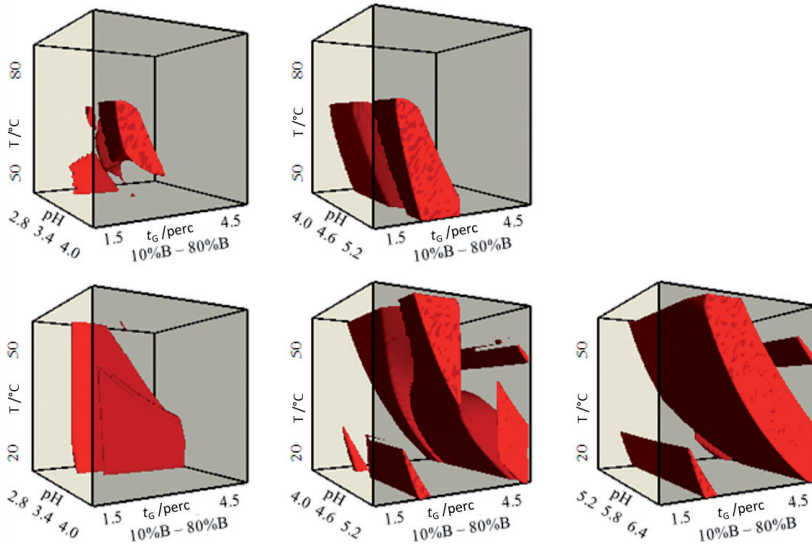
A tárgyalt esetben eltekintünk a  $\log D$ -pH függvény meghatározásától, ehelyett egy kiterjesztett DryLab  $t_G$ - $T$ -pH modellt készítünk a korábban leírt feltételeket alkalmazva. Ez azt jelenti, hogy hat megtervezett kockát készítünk, ahol 60 °C-os hőmérséklet- és 3,6-es pH-tartományban vizsgáljuk a rendszerünket. Pufferként citrátot választunk, mert ennek nagy a pufferkapacitása pH = 2,8 és 6,4 között, tehát a módszerfejlesztést ugyanazzal a pufferrel végezhetjük el az általunk választott pH-tartományban (állófázis: Acquity BEH C18 50 × 2,1 mm, 1,7 μm; mozgófázis: „A” = 10 mM citrát puffer, „B” = acetonitril; áramlási sebesség: 0,8 ml/perc).

A „kockaterveket” az 1.39. ábra szemlélteti. A hat kocka elkészítéséhez  $6 \times 12 = 72$  mérés helyett csupán 42 mérésre van szükségünk, hiszen a kockák között vannak átfedések. Az 50 °C-on mért eredmények alkalmazhatók mindkét hőmérséklet-tartományhoz (az egyiknek a felső, a másikkak az alsó értékét jelenti). A pH esetében a 4,0 és 5,2 értékhez tartozó mérések jelentik a kockák felső és alsó értékeit.



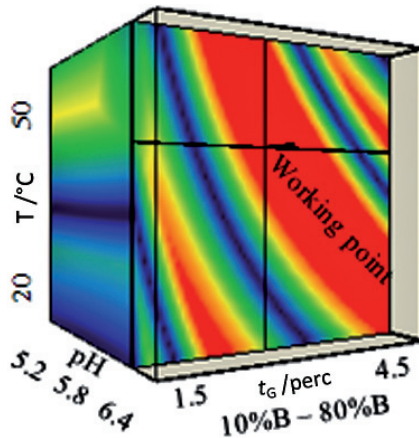
1.39. ábra. Design of Experiment hat kocka elkészítéséhez; az átfedések miatt elegendő 42 kísérletet végeznünk 72 helyett

A mérések elvégzése után megalkotjuk a kockákat, melyekben csak azokat a tartományokat tüntetjük fel, ahol az összes komponensre teljesül az  $R_{s,crit} > 1,5$  feltétel (1.40. ábra).



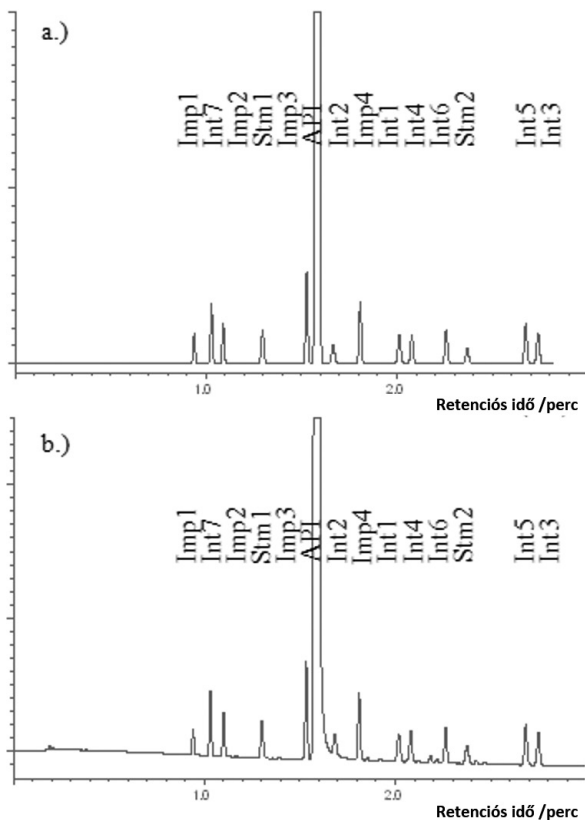
1.40. ábra. Az elkészített kockákban a piros színű tartományokat nevezzük *Design Space*-nek

A kísérletek során 80 °C-on, 5,2-es pH fölött az egyik komponens bomlik, így a magas hőmérsékleten pH = 5,2-6,4 tartományban lévő kockát nem tudjuk elkészíteni. A 2,8-4,0 és 4,0-5,2 tartományban néhány komponens retenciója nagyon pH-függő, vagyis nem tudunk robusztus módszert megvalósítani. A legjobb választás az alacsony hőmérséklet-tartományhoz tartozó pH = 5,2-6,4 tartomány; itt választottuk ki a mérési pontot, melynek paraméterei a következők:  $t_G = 4,0$  (10% B-80% B),  $T = 40\text{ °C}$ , pH = 6,2 (1.41. ábra).



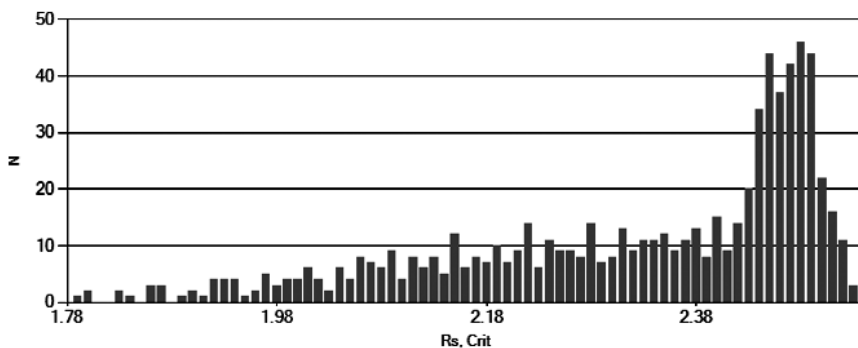
1.41. ábra. A választott kocka a munkaponttal

A szimulált a.) és a mért b.) kromatogramok (1.42. ábra) a korábbiakhoz hasonlóan itt is nagyon jó egyezést mutatnak.



1.42. ábra. A szimulált a.) és a mért b.) kromatogramok

Az előző példához hasonlóan itt is beállítjuk a kiválasztott mérési ponthoz tartozó megengedett mérési paraméter-eltéréseket (1.6. táblázat).

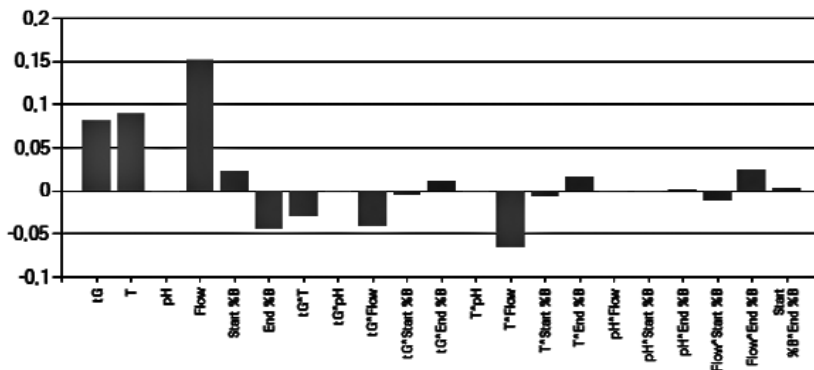


1.43. ábra. A 729 robusztus kísérlet  $R_{s,crit}$  értékeinek eloszlása

1.6. táblázat. Kromatográfias paraméterek és megengedett eltéréseik

Paraméterek	Értékek	Eltérés
$t_G$ /perc	4,0	$\pm 0,1$
$T$ /°C	40	$\pm 1$
pH	6,2	$\pm 0,2$
áramlás /(mL/perc)	0,80	$\pm 0,04$
start % B	10	$\pm 1$
végző % B	80	$\pm 1$

A beállított robusztusságpármetereken elvégzett szimuláció eredményeit látjuk az 1.43. és 1.44. ábrákon. Megállapítható, hogy mind a 729 kísérleti paraméter teljesíti az  $R_{s,crit} > 1,5$  feltételt, illetve hogy ilyen körülmények között az áramlási sebességnek, a hőmérsékletnek, a gradiens időnek, és ezek kombinációinak van a legnagyobb hatása az elválasztásra. Megjegyezzük továbbá, hogy a gyakorlatban nem kell minden paraméterre ilyen széles tartományokat megadni, hiszen a mai modern készülékek nagyon jól reprodukálhatóan működnek a rendeltetésszerű használatukkor.



1.44. ábra. A kromatográfias paraméterek hatása a felbontásra

## 1.4. Szuperkritikus és szubkritikus fluid kromatográfia

A szuperkritikus fluid kromatográfia (SFC) olyan kromatográfias elválasztási módszer, melyben a mozgófázis közel szuperkritikus állapotú fluidum. A „szuperkritikus” megnevezés, illetve SFC rövidítés annak ellenére elterjedt, hogy a valóságban a mozgófázis szubkritikus állapotú

fluidum (az angol nyelvű szakirodalomban gyakran használt elnevezés a „subcritical fluid chromatography” vagy újabban az „enhanced fluidity chromatography”). Az oszlopban található állófázis vagy kis méretű szilárd szemcsékből áll (mint például a folyadékkromatográfiában is használt szilikagél, porózus grafit és kémiailag módosított állófázisok), vagy – kapilláris oszlopok esetében – lehet térhálós folyadékfilm, mely egyenletes filmbevonatot képez a oszlop falán. Ez a kromatográfiás módszer már több mint 50 éve ismert; Klesper nevéhez kötik, aki már 1962-ben beszámolt a technika lehetőségeiről.<sup>81</sup> Az SFC akkor nem terjedt el, mert a készülékek műszaki szempontból nem voltak megfelelőek, de 2008-ban, az „acetonitrilválság” idején, mind az ipari, mind az akadémiai szakemberek újrarendelték az SFC lehetőségeit.

Szuperkritikus vagy közel szuperkritikus állapotban bizonyos anyagok sűrűsége és oldási képessége hasonló a folyadékkromatográfiás mozgófázisokéhoz, míg viszkozitása és diffúziós tulajdonságai pedig a gázok és a folyadékok között van. Utóbbi sajátágaikból fakadóan bennük az anyagátadás gyorsabb, mint a folyadékkromatográfiában, de ugyanakkor lassúbb a gázkromatográfiában szokásoshoz képest. A folyadékoknál kisebb viszkozitásuk miatt a nyomásesés is kisebb, mint a folyadékkromatográfiában. A szuperkritikus fluidumokban a komponensek diffúziós állandói nagyobbak a folyadékokénál, az anyagátadási ellenállásuk kisebb még nagy lineáris sebességeken is. Ez az oka annak, hogy hatékony elválasztásokat lehet elvégezni a mozgófázis lineáris sebességének növelésével, emiatt ezt a módszert is a gyors folyadékkromatográfiás módszerek közé sorolhatjuk.

Novotny és Lee munkáinak köszönhetően először a kapilláris SFC-t vezették be a gyakorlati életbe (c-SFC).<sup>82-87</sup> A c-SFC-ben a szén-dioxid mellett szénhidrogéneket, dinitrogén-oxidot és ammóniát alkalmaztak mozgófázisként, és a gázkromatográfia egyfajta kiterjesztésének tekintették. Biztonsági és technikai okokból azonban hamarosan a szén-dioxid (kritikus pontja: 31 °C, 74 bar) vette át a mozgófázisok között a vezető szerepet. A szuperkritikus szén-dioxidot mozgófázisként sikeresen alkalmazták hőlabilis komponensek elválasztására,<sup>88,89</sup> ekkortájt gázkromatográfokat üzemeltettek szuperkritikus mozgófázissal, és leggyakrabban lángionizációs detektorokat használtak. Az első SFC-készülék 1983-ban került piacra a Hewlett Packard cég jóvoltából. Ez a készülék már lehetővé tette a töltetes kolonnák alkalmazását (packed SFC, p-SFC), sőt, először nyílt lehetőség arra, hogy a szuperkritikus mozgófázist egyéb oldószerekkel (pl. metanol) keverjük.<sup>90</sup> A p-SFC számos előnyt mutatott (több lehetőség a szelektivitás hangolására, rövid

analízisidő, poláris komponensek elválasztásának lehetősége), mégis egy évtizedbe telt, mire elfogadott kromatográfias technikává érett. A 90-es évekre a kapilláris SFC kezdett visszaszorulni a technikai problémák és a szűk alkalmazási területe miatt.

Mivel a tiszta szén-dioxid apoláris, ezért csak apoláris komponenseket képes oldani, így felhasználása kizárólag a nempoláris anyagok és petrolkémiai alkotók elválasztására korlátozódott – ezzel szemben a p-SFC számos területen nyert alkalmazást. Berger, a modern SFC egyik úttörője, szerint a kétkomponensű (szén-dioxid és egy szerves modifikátor) mozgófázisok alkalmazásával az SFC felhasználási lehetőségei, illetve a segítségével megvalósított elválasztások kinetikai hatékonysága valahová a gáz- és a folyadékkromatográfiaié közé esik.<sup>91</sup> Elsősorban metanolt, etanolt és izopropanolt használtak szerves modifikátorokként, mely poláris oldószerek jelentősen növelték a vegyületek oldhatóságát, s egyben a megfelelő „mozgófázis-erősséget” is be lehetett velük állítani. Kis mennyiségű poláris modifikátor hozzáadásával a szuperkritikus fluidum még megtartja kis viszkozitását, így a diffúzió gyors lesz, aminek eredményeként az anyagátadás sebessége nő.<sup>92</sup>

Jelenleg az SFC legfőbb előnyei a következők:

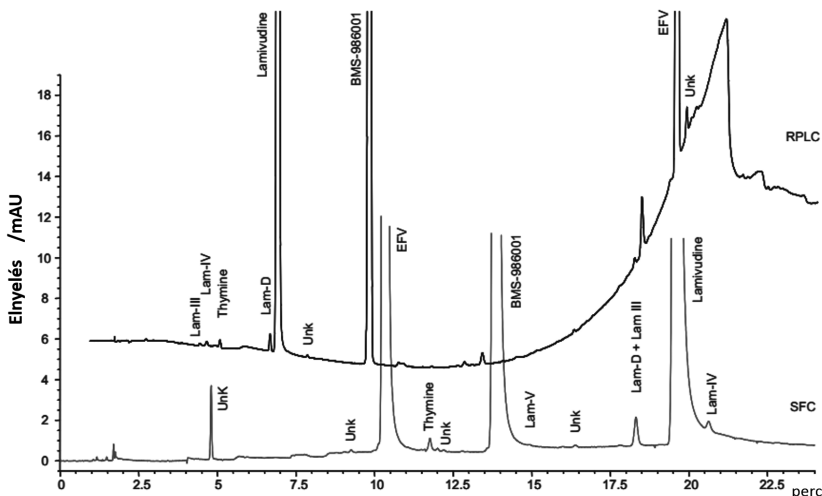
- a mozgófázis viszkozitása kisebb, mint a folyadékoké, ebből következően gyorsabb a molekuláris diffúzió, keskenyebbek a kromatográfias csúcsok;
- a kis viszkozitás megengedi nagy áramlási sebességek használatát a kinetikai hatékonyság csökkenése nélkül;
- a kritikus elválasztások is megvalósíthatók a kolonnák sorba kapcsolásával.

Mivel a gyakorlatban általában 2-25% szerves modifikátort adunk a mozgófázishoz, tehát a szerves oldószert felhasználása csökkent mértékű, ezért sokszor ún. „zöld” vagy környezetbarát elválasztási technikának tekintik az SFC-t. Ennek különösen a félpreparatív és – a gyógyszeriparban gyakori – preparatív elválasztásokban van jelentősége.

Az SFC másik gyakran emlegetett előnyös tulajdonsága az, hogy a fordított fázisú kromatográfiahoz képest (ami a leggyakoribb gyógyszer-analitikai elválasztási mód) ún. ortogonális vagy alternatív szelektivitást biztosít. A szén-dioxid apoláris mozgófázis, az SFC-ben alkalmazott állófázisok pedig polárisak, tehát a szelektivitás a normál fázisú kromatográfiaéhoz hasonló. Jól alkalmazható királis elválasztásokra is, a legtöbb enantiomerelválasztás megoldható poláris poliszacharid típusú állófázisokon szuperkritikus körülmények között.

A modern SFC alkalmazási területe jelenleg rendkívül széles. SFC-vel olyan poláris komponenseket is lehet mérni, amelyeket fordított fázisú kromatográfiás körülmények között nem lehetséges, mivel az utóbbi esetben nincs megfelelő visszatartás. SFC-ben a szelektivitás és a visszatartás elsősorban az állófázissal változtatható, de mindkét kromatográfiás paramétert a poláris modifikátor minősége és koncentrációja nagyban befolyásolja. A leggyakrabban alkalmazott poláris állófázisok a szilika, diol, ciano és 2-etilpiridin típusúak, ezeket főleg poláris vagy könnyen protonálható/deprotonálható komponensek elválasztására használhatjuk.

Az SFC fejlesztési irányai jelenleg azonosak a fordított fázisú kromatográfiáéival, itt is megjelentek a 2  $\mu\text{m}$  alatti porózus töltetek, kis átmérőjű rövid kolonnák, és a kis oszlopon kívüli diszperzióval rendelkező újgenerációs készülékek.<sup>93</sup> A 2  $\mu\text{m}$  alatti töltetekkel hasonló kinetikai hatékonyság érhető el, mint az UHPLC-ben, ez vezetett az új nomenklatura megszületéséhez, nevezetesen az UHPSFC-hez (ultranagy-hatékonyságú szuperkritikus fluid kromatográfia).<sup>94</sup> Nemrégiben héjszerkezetű töltetek alkalmazásáról is beszámoltak, amelyekkel körülbelül 50%-os kinetikai hatékonyságnövelés érhető el a 3  $\mu\text{m}$ -es teljesen porózus töltetekhez képest (hasonlóan, mint a fordított fázisú kromatográfiában).<sup>95,96</sup>

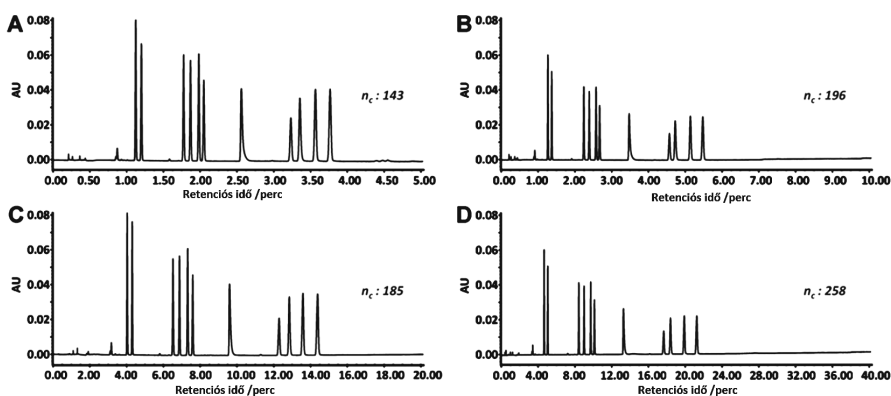


1.45. ábra. Antiretrovirális hatóanyagokat tartalmazó kombinált gyógyszerkészítmény bomlásvizsgálata fordított fázisú kromatográfiával (RP-LC, felül) és szuperkritikus fluid kromatográfiás módszerrel (SFC, alul)

A modern SFC, UHPSFC – sokszínűségének köszönhetően – a korábban említett preparatív és királis elválasztások mellett egyre jobban kezd elterjedni a gyógyszeripari kutató és minőség-ellenőrző laboratóriumokban.

Alexander és mtsai. fordított fázisú folyadékkromatográfiás és ortogonális szelektivitást biztosító SFC-módszert mutattak be antiretrovirális hatóanyagokat (lamivudin, efavirenz és fesztinavir) tartalmazó kombinált gyógyszerkészítmény minősítésére,<sup>97</sup> melyet be is vezettek gyógyszeripari minőségellenőrző laboratóriumban. Az 1.45. ábrán a kétféle elválasztást mutatjuk be.

Taylor és mtsai. peptideket választottak el SFC-körülmények között,<sup>98</sup> melynek során a termer mozgófázis (szén-dioxid–metanol–víz) vizes részébe ionpárképző adalékot (trifluorecetsav, ammónium-acetát) adtak. Perrenoud gyógyszerhatóanyagok elválasztására dolgozott ki UHPSFC-módszereket, és részletesen tanulmányozta a kinetikai hatékonyság fokozásának lehetőségeit.<sup>99</sup> Kolonnák sorba kapcsolásával és a gradiens körülmények megfelelő módosításával igen nagy csúscapacitásokat értek el viszonylag rövid analízisidő mellett (1.46. ábra).



1.46. ábra. Benzodiazepinek UHPSFC-s elválasztása. Elúciós sorrend: prazepám, flunitrazepám, klórazepát, dezmetilflunitrazepám, nitrazepám, klonazepám, midazolám, brotizolám, 7-aminoflunitrazepám, alprazolám és triazolám). Kolonna: Acquity UPC2 BEH 100 mm × 3 mm, 1,7 μm, mozgófázis-hőmérséklet: 40 °C, hátsó nyomás: 150 bar, gradiens elúció: 2-17% MeOH, térfogatáram: 2,5 mL/perc, gradiens idő: 5 perc (A) és 10 perc (B). Két oszlop sorba kötésével (20 cm-es oszlop), térfogatáram: 1,25 mL/min, gradiens idő: 20 perc (C) és 40 perc (D)

A szuperkritikus fluid kromatográfia – elsősorban az UHPSFC – egyre jobban kezd elterjedni, és úgy tűnik, hogy a gyógyszeripar is kezdi elfogadni a technikában rejlő lehetőségeket, ezért a fordított fázisú folyadékkromatográfia ígéretes kiegészítő módszere lehet a közeljövőben.



## 1.5. Irodalom

### Ajánlott irodalom:

Xu, Q. A. ed. *Ultra-High Performance Liquid Chromatography and Its Applications*, John Wiley & Sons: New York, **2013**.

Guillarme, D.; Veuthey, J.-L. ed. *UHPLC in Life Sciences*, RSC Chromatography Monographs, **2012**.

Snyder, L. R.; Kirkland, J. J.; Dolan, J. W. *Introduction to Modern Liquid Chromatography*, John Wiley & Sons: New York, **2010**.

Corradini, D. Philips, T. M. ed. *Handbook of HPLC*, CRC Press, **2010**.

Kazakevich, Y.; LoBrutto, R. *HPLC for Pharmaceutical Scientists*, John Wiley & Sons: New York, **2007**.

Fekete Jenő, *Folyadékkromatográfia elmélete és gyakorlata*, Edison House, **2006**.

1. Fekete, Sz.; Fekete, J. *J. Chromatogr. A* **2011**, *1218*, 5286.
2. Wu, N.; Bradley, A. C. *J. Chromatogr. A* **2012**, *1261*, 113.
3. Lestremau, F.; Wu, D.; Szucs, R. *J. Chromatogr. A* **2010**, *1217*, 4925.
4. Gritti, F.; Sanchez, C. A.; Farkas, T.; Guiochon, G. *J. Chromatogr. A* **2010**, *1217*, 3000.
5. Alexander, A. J.; Waeghe, T. J.; Himes, K. W.; Tomasella, F. P.; Hooker, T. F. *J. Chromatogr. A* **2011**, *1218*, 5456.
6. Omamogho, J. O.; Hanrahan, J. P.; Tobin, J.; Glennon, J. D. *J. Chromatogr. A* **2011**, *1218*, 1942.
7. Sanchez, A. C.; Anspach, J. A.; Farkas, T. *J. Chromatogr. A* **2012**, *1228*, 338.
8. Dolan, J. W. *LCGC North America* **2006**, *24*, 458.
9. Fekete, Sz.; Koehler, I.; Rudaz, S.; Guillarme, D. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2014**, *87*, 105.
10. Halász, I.; Endele, R.; Asshauer, J. *J. Chromatogr.* **1975**, *12*, 37.
11. Neue, U. D.; Kele, M. *J. Chromatogr. A.* **2007**, *1149*, 236.
12. Swartz, M. E.; Murphy, B. *American Laboratory* **2005**, *37*, 22.
13. Swartz, M. E. *J. Liquid Chrom.* **2005**, *28*, 1253.
14. Gritti, F.; Farkas, T.; Heng, J.; Guiochon, G. *J. Chromatogr. A.* **2011**, *1218*, 8209.
15. Wang, J.; Li, H.; Jin, C.; Qu, Y.; Xiao, X. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2008**, *47*, 765.
16. Fekete, Sz.; Fekete, J.; Molnár, I.; Ganzler, K. *J. Chromatogr. A.* **2009**, *1216*, 7816.
17. Fekete, Sz.; Fekete, J.; Ganzler, K. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2009**, *49*, 833.
18. Horváth, Cs.; Preiss, B. A.; Lipsky, S. R. *Anal. Chem.* **1967**, *39*, 1422.
19. Horváth, Cs.; Lipsky, S. R. *J. Chromatogr. Sci.* **1969**, *7*, 109.
20. Kirkland, J. J. *Anal. Chem.* **1969**, *41*, 218.
21. Gritti, F.; Cavazzini, A.; Marchetti, N.; Guiochon, G. *J. Chromatogr. A.* **2007**, *1157*, 289.
22. Kaczmarski, K.; Guiochon, G. *Anal. Chem.* **2007**, *79*, 4648.
23. Gritti, F.; Guiochon, G. *AIChE J., AIChE-09-11893*
24. Gritti, F.; Guiochon, G. *J. Chromatogr. A.* **2012**, *1218*, 31.
25. Cabooter, D.; Fanigliulo, A.; Bellazzi, G.; Allieri, B.; Rottigni, A.; Desmet, G. *J. Chromatogr. A.* **2010**, *1217*, 7074.
26. Ruta, J.; Zurlino, D.; Grivel, C.; Heinisch, S.; Veuthey, J. L.; Guillarme, D. *J. Chromatogr. A.* **2012**, *1228*, 221.

27. Fekete, Sz.; Berky, R.; Fekete, J.; Veuthey, J. L.; Guillarme, D. *J. Chromatogr. A* **2012**, *1236*, 177.
28. Fekete, Sz.; Berky, R.; Fekete, J.; Veuthey, J. L.; Guillarme, D. *J. Chromatogr. A* **2012**, *1252*, 90.
29. Silvestro, L.; Gheorghe, M. C.; Tarcomnicu, I.; Savu, S.; Savu, S. R.; Iordachescu, A.; Dule, C. *J. Chromatogr. B* **2010**, *878*, 3134.
30. Abraham, A.; Sayah, M. A.; Skrdla, P.; Bereznitski, Y.; Chen, Y.; Wu, N. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2010**, *51*, 131.
31. Heinig, K.; Wirz, T.; Bucheli, F.; Monin, V.; Gloge, A. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2011**, *54*, 742.
32. Saida, R.; Pohanka, A.; Andersson, M.; Becka, O.; Rehim, M. A. *J. Chromatogr. B* **2011**, *879*, 815.
33. Fekete, Sz.; Ganzler, K.; Fekete, J. *J. Chromatogr. A* **2010**, *1217*, 6258.
34. Hjertén, S.; Liao, J. L.; Zhang, R. *J. Chromatogr.* **1989**, *473*, 273.
35. Svec, F.; Frechet, J. M. *J. Anal. Chem.* **1992**, *64*, 820.
36. Gusev, I.; Huang, X.; Horvath, C. *J. Chromatogr. A* **1999**, *885*, 273.
37. Minakuchi, H.; Nagayama, H.; Soga, N.; Ishizuka, N.; Tanaka, N. *J. Chromatogr. A* **1998**, *797*, 121.
38. Hormann, K.; Müllner, T.; Bruns, S.; Hölzel, A.; Tallarek, U. *J. Chromatogr. A* **2012**, *1222*, 46.
39. Greider, A.; Trojer, L.; Huck, C. W.; Bonn, G. K. *J. Chromatogr. A* **2009**, *1216*, 7747.
40. Levkin, P. A.; Eeltink, S.; Stratton, T. R.; Brennen, R.; Robotti, K.; Yin, H.; Killeen, K.; Svec, F.; Fréchet, J. M. *J. Chromatogr. A* **2008**, *1200*, 55.
41. Li, Y. Y.; Tolley, H. D.; Lee, M. L. *Anal. Chem.* **2009**, *81*, 9416.
42. Sneekes, E. J.; Hun, J.; Elliot, M.; Ausio, J.; Borchers, C. *J. Sep. Sci.* **2009**, *32*, 2691.
43. Holzl, G.; Oberacher, H.; Pitsch, S.; Stutz, A.; Huber, C. G.; *Anal. Chem.* **2005**, *77*, 673.
44. Oberacher, H.; Parson, W.; Oefner, P. J.; Mayr, B. M.; Huber, C.G. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2004**, *15*, 510.
45. Fekete, Sz.; Veuthey, J. L.; Eeltink, S.; Guillarme, D. *Anal. Bioanal. Chem.* **2013**, *405*, 3137.
46. Vuignier, K.; Fekete, Sz.; Carrupt, P. A.; Veuthey, J. L.; Guillarme, D. *J. Sep. Sci.* **2013**, *36*, 2231.
47. Oláh, E.; Fekete, Sz.; Fekete, J.; Ganzler, K. *J. Chromatogr. A* **2010**, *1217*, 3642.
48. Desmet, G.; Clicq, D.; Gzil, P. *Anal. Chem.* **2005**, *77*, 4058.
49. Fekete, Sz.; Fekete, J. *Talanta* **2011**, *84*, 416.
50. Antia, F. D.; Horvath, Cs. *J. Chromatogr.* **1988**, *435*, 1.
51. Chen, H.; Horváth, Cs. *J. Chromatogr.* **1995**, *705*, 3.
52. Greibrokk, T.; Andersen, T. *J. Chromatogr. A* **2003**, *1000*, 743.
53. Fields, S. M.; Ye, C. Q.; Zhang, D. D.; Branch, B. R.; Zhang, X. J.; Okafe, N. *J. Chromatogr. A* **2001**, *913*, 197.
54. Heinisch, S.; Rocca, J. L. *J. Chromatogr. A* **2009**, *1216*, 642.
55. Dolan, J. W. *LCGC Europe* **2002**, *15*, 216.
56. Nawrocki, J.; Dunlap, C.; McCormick, A.; Carr, P. W.; Pert, I. *J. Chromatogr. A* **2004**, *1028*, 1.
57. Nawrocki, J.; Dunlap, C.; Li, J.; Zhao, J.; McNeff, C. V.; McCormick, A.; Carr, P. W.; Part, I. I. *J. Chromatogr. A* **2004**, *1028*, 31.

58. Neff, C. Mc.; Zigan, L.; Johnson, K.; Carr, P. W.; Wang, A.; Weber-Main, A. M. *LCGC*. **2000**, *18*, 514.
59. Nguyen, D. T. T.; Guillaume, D.; Heinisch, S.; Barrioulet, M. P.; Rocca, J. L.; Rudaz, S.; Veuthey, J. L. *J. Chromatogr. A*. **2007**, *1167*, 76.
60. Berta, R.; Babják, M.; Gazdag, M. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2011**, *54*, 458.
61. Fekete, Sz.; Guillaume, D. *LCGC Europe* **2012**, *25*, 540.
62. ICH Q8 (R2)-Guideline for Pharmaceutical Development **2009**.
63. Kazakevich, Y.; LoBrutto R. (ed.) *HPLC for Pharmaceutical Scientists* John Wiley & Sons Inc.: New Jersey, **2007**.
64. Snyder, L. R.; Kirkland J. J.; Dolan, J. W. *Introduction to Liquid Chromatography* John Wiley & Sons Inc.: New Jersey, **2010**.
65. Mannhold, R.; Dross, K. *Quantitative Structure-activity Relationships* **1996**, *15*, 403.
66. Petruskas, A. A.; Kolovanov, E. A. *Perspectives in Drug Discovery and Design* **2000**, *19*, 99.
67. LoBrutto, R.; Jones, A.; Kazakevich, Y. V.; McNair, H. M. *J. Chromatogr. A*. **2001**, *913*, 173.
68. Kirkland J. J.; Glajch, J. L. *J. Chromatogr.* **1983**, *255*, 27.
69. Molnar, I. *J. Chromatogr. A*. **2002**, *965*, 175.
70. Fekete, Sz.; Fekete, J.; Molnár, I.; Ganzler, K. *J. Chromatogr. A*. **2009**, *1216*, 7816.
71. Eurby, M. R.; Schad, G.; Rieger, H.-J.; Molnár, I. *Chromatography Today*, **2010** Dec. 13.
72. Horváth, Cs.; Melander, W.; Molnár, I. *J. Chromatogr.* **1976**, *125*, 129.
73. Molnár, I. *Chromatographia Suppl.* **2005**, *62*, S7.
74. Molnár, I.; Rieger, H.-J.; Monks, K. E. *J. Chromatogr. A*. **2010**, *1217*, 3193.
75. Monks, K. E.; Rieger, H.-J.; Molnár, I. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2011**, *56*, 874.
76. Kormány, R.; Molnár, I.; Rieger, H.-J. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2013**, *80*, 79.
77. Kormány, R.; Rieger, H.-J.; Molnár, I. *LCGC North America* **2013** April *S4a* 20.
78. Molnár, I.; Rieger, H.-J.; Kormány, R.; *Chromatography Today* **2013**, *6/1*, 3.
79. Monks, K.; Molnár, I.; Rieger, H.-J.; Bogáti, B.; Szabó, E. *J. Chromatogr. A*. **2012**, *1232*, 218.
80. Schmidt, A. H.; Molnár, I. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2013**, *78-79*, 65.
81. Klesper, E.; Corwin, A. H.; Turner, D. A. *J. Org. Chem.* **1962**, *27*, 700.
82. Novotny, M.; Springston, S. R.; Peaden, P. A.; Fjeldsted, J. C. Lee, M. L. *Anal. Chem.* **1981**, *53*, 407.
83. Peaden, P. A.; Fjeldsted, J. C.; Lee, M. L.; Springston, S. R.; Novotny, M. *Anal. Chem.* **1982**, *54*, 1090.
84. Springston, S. R.; Novotny, M. *Chromatographia* **1981**, *14*, 679.
85. Peaden, P. A.; Lee, M. L. *J. Chromatogr.* **1983**, *259*, 1.
86. Kuei, J. C.; Tarbet, B. J.; Jackson, W. P.; Bradshaw, J. S.; Markides, K. E.; Lee, M. L. *Chromatographia* **1985**, *20*, 25.
87. Jackson, W. P.; Richter, B. E.; Fjeldsted, J. C.; Kong, R. C.; Lee, M. L. *ACS Symp. Ser.* **1984**, *250*, 121.
88. Markides, K. E.; Fields, S. M.; Lee, M. L. *J. Chromatogr. Sci.* **1986**, *24*, 254.
89. Smith, R. D.; Fjeldsted, J.; Lee, M. L. *Int. J. Mass Spectrom. Ion Phys.* **1983**, *46*, 217.
90. Randall, L.G. *ACS Symp. Ser.* **1984**, *250*, 135.
91. Schoenmakers, P. J.; Uunk, L. G. M. *Chromatographia* **1987**, *24*, 51.

92. Olesik, S. V.; Woodruff, J. L. *Anal. Chem.* **1991**, *63*, 670.
93. Grand-Guillaume Perrenoud, A.; Goel, M. ; Hamman, C.; Veuthey, J. L.; Guillaume, D.; Fekete, Sz. *J. Chromatogr. A.* **2013**, *1314*, 288.
94. Grand-Guillaume Perrenoud, A.; Boccard, J. ; Veuthey, J. L.; Guillaume, D. *J. Chromatogr. A.* **2012**, *1262*, 205.
95. Berger, T .A. *J. Chromatogr. A.* **2011**, *1218*, 4559.
96. Lesellier, E. *J. Chromatogr. A.* **2012**, *1228*, 89.
97. Alexander, A. J.; Zhang, L.; Hooker, T. F.; Tomasella, F. P.; *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2013**, *78*, 243.
98. Patel, M. A.; Riley, F.; Ashraf-Khorassani, M.; Taylor, L. T. *J. Chromatogr. A.* **2012**, *1233*, 85.
99. Grand-Guillaume Perrenoud, A.; Veuthey, J. L. ; Guillaume, D. *J. Chromatogr. A.* **2012**, *1266*, 158.

## 2. Termikus analízis

*Pokol György, Madarász János*

### 2.1. Bevezetés

Valószínűleg a tűz felhasználásával egyidős annak felismerése és felhasználása, hogy a hevítés és hűtés közben lejátszódó folyamatok megfigyelésével a különböző anyagok összetételéről, tulajdonságairól sok mindent meg lehet tudni. Történeti szempontból ebből eredeztethető a termikus analízis, melynek fő módszerei a XIX. és XX. században alakultak ki.

Azokat a módszereket soroljuk a termikus analízis körébe, melyekben a vizsgálati anyagból vett minta hőmérsékletét hőmérsékletprogram szerint változtatjuk, s eközben valamilyen fizikai vagy kémiai sajátosság vagy sajátosságok változását követjük. Így például, ha a hőmérséklet-program végrehajtása közben a tömeget (annak csökkenését vagy növekedését) mérjük, termogravimetriáról van szó, ha a minta entalpiaváltozását követjük, differenciális pásztázó kalorimetriáról (DSC) beszélünk, míg a szilárd vagy folyékony mintából felszabaduló gázok vagy gőzök minőségének és mennyiségének leírását fejlődőgáz-elemzésnek (EGA) nevezik. A gyógyszerkutató és gyógyszer-analitika szempontjából fontosabb termoanalitikai módszereket a 2.1. táblázatban soroljuk fel.

A fenti definíció fontos eleme a hőmérsékletprogram, vagyis az, hogy a kísérletben a hőmérséklet nem spontán, hanem tervezett módon alakul (így tehát pl. az adiabatikus kalorimetria nem része a termikus analízisnek). A hőmérsékletprogram matematikailag egy hőmérséklet–idő függvény, következésképpen a mérés közvetlen eredménye egy termoanalitikai görbe, mely a megfigyelt tulajdonság változását a hőmérséklet vagy az idő függvényében adja meg.

A termoanalitikai mérés technikák kondenzált, leggyakrabban szilárd anyagok jellemzésére alkalmasak. A módszerek többsége nem igényel bonyolult minta-előkészítést, gyakori, hogy a vizsgálati anyag (pl. szilárd por) részletét minden előzetes kezelés nélkül behelyezhetjük a mérőkészülékbe.

A termoanalitikai mérések célja háromféle lehet:

- a) A minta összetételének megállapítása. Itt a kémiai összetétel mellett gyakran a fázisok szerinti összetétel (pl. polimorf módosulatok mennyiségének aránya) is kérdés lehet.

- b) A minta bizonyos fizikai, illetve fizikai-kémiai paramétereinek meghatározása (pl. olvadáshő, amorf polimerek üvegesedési hőmérséklete), vagy ilyen paraméterek (pl. a fahő, hőtágulási együttható stb.) hőmérsékletfüggésének leírása.
- c) Fázisátalakulások és kémiai reakciók követése az idő és/vagy a hőmérséklet függvényében. Az ilyen alkalmazások között megjelenik mind a lejátszódó folyamatok kvalitatív leírása (pl. hogy a kiindulási anyagból milyen hőmérséklet-tartományban milyen termékek jönnek létre), mind pedig az átalakulások termodinamikájának és kinetikájának számszerű jellemzése.

2.1. táblázat. A fontosabb termoanalitikai módszerek

Vizsgált tulajdonság	Elnevezés	Angol elnevezés	Rövidítés
Tömeg	termogravimetria derivatív termogravimetria	thermogravimetry, thermogravimetric analysis; derivative thermogravimetry	TG, TGA DTG
Felszabaduló gázok minősége és mennyisége	fejlődőgáz-analízis (fejlődőgáz-detektálás)	evolved gas analysis, (evolved gas detection)	EGA (EGD)
Entalpia-változás	differenciális termikus analízis; differenciális pásztázó (szkenning) kalorimetria	differential thermal analysis; differential scanning calorimetry	DTA  DSC
Méret	termodilatometria	thermodilatometry	TD
Mechanikai tulajdonság	termomechanikai analízis; dinamikus termomechanikai analízis	thermomechanical analysis; dynamic mechanical analysis	TMA DMA
Külső megjelenés, optikai tulajdonságok	termo-mikroszkópia; termo-optometria	hot-stage (FTIR, Raman, VIS) microscopy; thermo-optometry	

Ahogy arra az előzőekben rámutattunk, a termoanalitikai vizsgálatokhoz legtöbbször szilárd, ritkábban folyékony mintát mérünk be. Mivel a

hőmérséklet változása közben általában fázisátalakulások és/vagy kémiai reakciók játszódnak le, a mérési eredményekre a minta sajátosságain (összetétel, szerkezet, morfológia) kívül a kísérleti körülmények (hevítési sebesség, a minta nagysága, a mintával érintkező gáz minősége stb.) is hatnak. Úgy is fogalmazhatunk, hogy a termikus analízis mérőkészülékei kis, programozott reaktorok, melyekben az átalakulás lefolyását a minta anyagi tulajdonságai és a műveleti paraméterek együtt határozzák meg.

A termikus analízis – ahogy a fenti vázlatos áttekintés is mutatja – sok módszert foglal magában. Alkalmazása is szerteágazó: az anyagtudománytól a biológiai rendszerek vizsgálatáig terjed. A jelen fejezet – tekintettel a kötet céljára és a szabott terjedelemre – nem törekszik teljességre a gyógyszerekkel kapcsolatos lehetőségek ismertetésében sem. Ehelyett azokra a módszerekre és alkalmazásokra koncentrálnak, melyek a gyógyszerhatóanyagok kutatásában leginkább beváltak és – véleményünk szerint – a jövőben is nélkülözhetetlenek lesznek. A méréstechnikák közül a termogravimetriát (TG), a differenciális pásztázó kalorimetriát (DSC) és a fejlődőgáz-elemzést (EGA) tárgyaljuk részletesen. A témakörök, illetve alkalmazások közül a polimorfira, a hidrátokra, szolvátokra és más szupramolekuláris vegyületekre, a szilárd-olvadék fázisdiagramokra, valamint a bomlási folyamatokra koncentrálnak. Ez a súlypontosítás természetesen azzal jár, hogy más témakörök kimaradnak vagy csak említésszerűen jelennek meg. Ilyenek elsősorban a polimerek termoanalitikája, és az ehhez kapcsolódó termomechanikai analízis (TMA) és dinamikus mechanikai analízis (DMA), amelyek egyébként a készítményfejlesztés szempontjából igen fontosak.

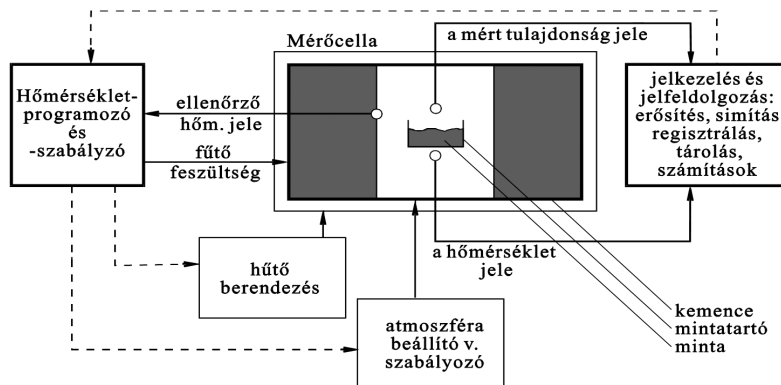
A termikus analízis alapjairól többek között Brown kézikönyvéből<sup>1</sup> tájékozódhatunk, a gyógyszerek termikus analíziséről pedig Craig és Reading kötete<sup>2</sup> jelent meg néhány éve.

## **2.2. A termoanalitikai mérőberendezések felépítése**

A termoanalitikai készülékek elvi felépítését a 2.1. ábrán mutatjuk be. A kemence villamos fűtésű. A program szerinti hűtésre (általában a kemencét hűtik, és ez vonja el a hőt a mintától) a hőmérséklet-tartomány és a kívánt hűtési sebesség szerint különböző hűtőközegeket használnak. A környezeti hőmérséklet felett ez lehet áramló levegő, vagy víz is. Sok berendezés használható szobahőmérséklet alatt is, ilyenkor a hűtőközeg



általában cseppfolyós nitrogén vagy a belőle fejlődő hideg gőz. Bizonyos mérőkészülékekben Peltier-elemes hűtést alkalmaznak.



2.1. ábra. A termoanalitikai berendezések fő egységei. A folytonos vonallal jelzett kapcsolatok minden modern készülékben működnek

A minta hőmérsékletéről és a vizsgált fizikai tulajdonságról egy-egy érzékelő ad jelet. A hőmérséklet mérésére a termikus analízisben leggyakrabban termoelemet használunk. A teljesítménykompenzációs DSC-készülékek (ld. később) a hőmérsékletet platina ellenállás-hőmérővel mérik. Igen nagy hőmérsékletekhez (1600 °C fölött) optikai pirométereket (is) használnak, ezek a hősugárzás jellemzői alapján adják meg a hőmérsékletet.

A termoelemek előnye, hogy „pontoszerű” mérést tesznek lehetővé (az érzékelő felület egy négyzetmilliméter törtrésze), hátrányuk, hogy az ellenállás-hőmérőknél pontatlanabbak.

A készülékek kifejlesztésekor arra törekednek, hogy a minta és a hőmérséklet-érzékelő között minél kisebb legyen a termikus ellenállás. Ennek ellenére számolnunk kell azzal, hogy a minta valóságos hőmérséklete a mért értéktől eltér, sőt gyakran számottevőek a mintán belüli hőmérséklet-különbségek is. Ha pl. egy hengeres tégelyben több száz mg porszerű anyagot hevítünk 10 °C/min sebességgel és az anyagban jelentős hőeffektussal járó reakció játszódik le (pl. bomlás), a mintán belüli hőmérséklet-különbség többször tíz fokot is kitesz.

A mai termoanalitikai berendezésekben vizsgált minták tömege általában mg nagyságrendű, sokszor ennél kisebb, így az előbb említett hőmérséklet-különbségek is kicsinyek, sokszor elhanyagolhatók. Lényegesen nagyobb tömegű minták mérése akkor indokolt, ha igen kis változást kell követni, vagy ha a vizsgálati anyag inhomogenitása miatt kis tömeg esetén nem reprezentatív a minta.



A hőmérséklet-programozó és -szabályozó egység a kívánt program és a valóságos hőmérséklet figyelembevételével változtatja a kemence fűtőfeszültségét (és esetleg kapcsolja a hűtőberendezést). A leggyakrabban állandó fűtési/hűtési sebességű és állandó hőmérsékletű programokat, illetve ezek kombinációit használják. Bizonyos célokra azonban jobban megfelelnek az olyan programok, melyekben a hőmérséklet alakulása attól is függ, hogy a mintában folyik-e reakció, és milyen sebességgel. Ilyenkor a minta mért tulajdonságának (pl. tömegének) változását is figyelembe veszik a hőmérséklet programozásában. Ezt szabályozott átalakulási sebességű termikus elemzésnek (Controlled Rate Thermal Analysis, CRTA) nevezik, melynek első megvalósítói a Paulik fivérek és Erdey<sup>3</sup> voltak.

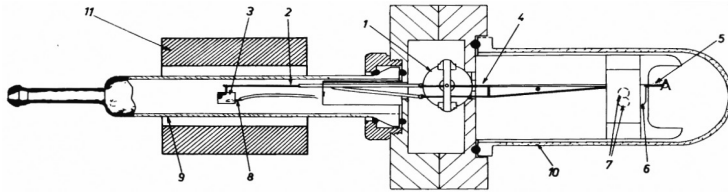
Számos készülékben szabályozható a mintatérben uralkodó nyomás, illetve program szerint változtatható az öblítógáz minősége és térfogat-árama is.

## 2.3. Termogravimetria

A termogravimetria (TG, TGA) a (szilárd vagy folyékony) minta tömegváltozását írja le az idő, illetve a hőmérséklet függvényében. A TG-görbét termomérleg segítségével veszik föl. Az eredmények áttekintését gyakran segíti a tömegváltozás sebességének az ábrázolása, ezt derivatív termogravimetriás (DTG-) görbének nevezik.

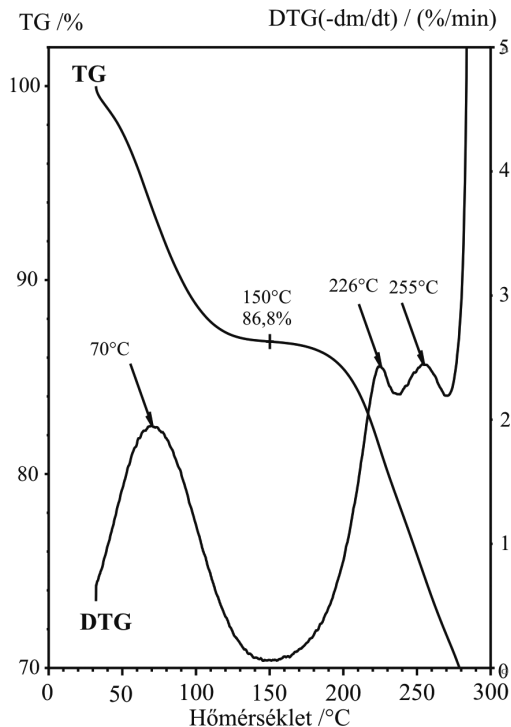
Az első, kereskedelemben is kapható termomérlegeket mechanikus analitikai mérlegekre építették föl, a szokásos bemérés néhány száz mg volt. Az ilyen nagyságú mintákon belül azonban igen nagy hőmérsékletkülönbségek (és sokszor koncentrációkülönbségek) alakulnak ki a változó hőmérsékletű kezelés közben a hő- és anyagtranszporttal szembeni ellenállás miatt. Ezért a mai készülékektől azt kívánjuk meg, hogy néhány mg-nyi (esetleg kisebb tömegű) minta tömegváltozását is megbízhatóan lehessen követni. A leggyakrabban alkalmazott hevítési sebességek: 5 és 10 °C/min.

A kis mintaméreteken kívül a változó hőmérséklet is nehezíti a pontos mérést: egyrészt mindig van konvekció (természetes vagy kényszeráramlás) a minta környezetében, másrészt a kemence munkaterének hőmérséklete helyről helyre változik. Ez utóbbi miatt általában nullamérlegelést célszerű használni, amikor is a mintára ható nehézségi erőnek a tömegváltozásból adódó csökkenését vagy növekedését egy visszacsatolás segítségével az elektronikus mérleg kiegyenlíti. Egy termomérleg vázlata látható a 2.2. ábrán.



2.2. ábra. Vízszintes elrendezésű termomérleg: 1 - tekercs, 2 - kvarcrúd, 3 - mintatartó, 4 - hideg mérlegkar, 5 - ellensúly, 6 - a mérlegkarra szerelt zászló, réssel, 7 - fotoérzékelők, 8 - minta termoelem, 9 - kvarccső, 10 - üvegbura, 11 - kemence (DuPont Instruments)

Ez a mérleg vízszintes elrendezésű, az egyik kar a fűtött térbe nyúlik. A karnak a fűtött térbe érő része kvarcüvegből készül, mert ennek igen csekély a hőtágulása. A mérleg másik karjának helyzetét egy fotodiódából álló detektor érzékeli. A készülék úgy változtatja a kiegyenlítő elektromágnes áramát, hogy a mérleg ne mozduljon el. A kompenzáló áram erőssége adja a tömegnek megfelelő jelet. A mintatéren át különböző öblítő gázokat vezethetünk keresztül; egyes készülékekben a mintateret evakuálni is lehet.



2.3. ábra. Gyógyszerhatóanyag TG- és DTG-görbéje (dehidratáció zajlik 150 °C-ig, majd azt követően termikus bomlás miatt lép fel tömegvesztés)

A 2.3. ábrán bemutatott TG- és DTG-görbék szakaszai egy kristályhidrát dehidratációjához és a vízmentes anyag bomlásához tartoznak. Mivel a termogravimetria a mintatartóban lévő szilárd anyagok és/vagy folyadékok tömegváltozással járó átalakulásait követi, a módszer eredményeit igen jól egészíthetik ki a mintából felszabaduló gáz halmazállapotú termékekről fejlődőgáz-analízissel (EGA), illetve kapcsolt módszerekkel szerzett információk, illetve az átalakulásokhoz tartozó entalpiaváltozások követése (DSC). (Magából a termogravimetriás vizsgálatból a fenti példában sem derül ki, hogy 150 °C-ig valóban víz távozik el.) Mindez fordítva is igaz: új anyag vizsgálatát mindig célszerű a termogravimetriával kezdeni. A későbbi fejezetek példáiban is általában bemutatjuk a TG-görbéket.

## 2.4. Differenciális pásztázó kalorimetria (DSC)

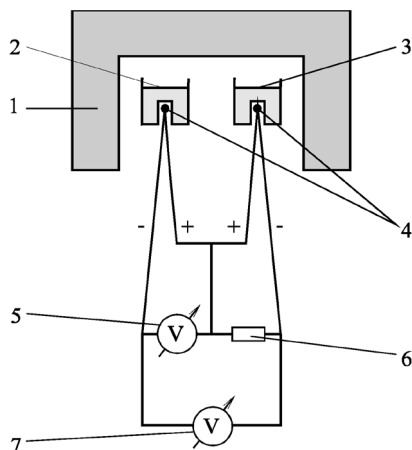
A mintában a hőmérsékletprogram végrehajtása közben lejátszódó folyamatok entalpiaváltozásának követésére két termoanalitikai módszer áll rendelkezésre: a DTA (differenciális termikus analízis) és a DSC (differenciális pásztázó kalorimetria).

Mindkét módszer a minta által felvett vagy leadott hő áramára jellemző jelet állít elő, és hasonló a DTA- és DSC-görbék alakja is. A DTA- és DSC-technikák között a felhasználás szempontjából az a döntő különbség, hogy az utóbbiak kvantitatív kalorimetriás meghatározásokra is alkalmasak (tehát olvadáshő, reakcióhő, fajhő meghatározására), míg a DTA-görbékben általában csak kvalitatív, az anyagban lejátszódó folyamatok hőmérséklet-tartományára, jellegére stb. vonatkozó felvilágosítást kaphatunk, és pontatlanabbak a kalorimetrikus adatok. Emiatt a gyógyszerek kutatásában és minőségbiztosításában ma már csak a DSC-t használják önálló módszerként. A DTA a szimultán mérésekben (ld. a Szimultán és kapcsolt módszerek c. fejezetben) jut szerephez, mivel a termogravimetriával együtt sokkal könnyebben megvalósítható, mint a DSC. Az, hogy a DTA nagy hőmérsékleteken (akár 1500 °C felett) is használható, a gyógyszerek vizsgálata szempontjából általában érdektelen. A DSC-módszer a DTA továbbfejlesztésével jött létre, és a DSC két alaptípusának egyike a DTA működési elvét használja. A mérés technikák fejlesztése során a szükséges mintaméret csökkentésével és konstrukciós megoldásokkal javítottak a DTA kalorimetriás megbízhatóságán, így – kivéve a nagy hőmérsékleteket – a két módszer különbsége elmosódott, ezért a részletes tárgyalást a DTA bemutatásával kezdjük.

### 2.4.1. A DTA és DSC működési elve

A DTA a ma is használt termoanalitikai módszerek közül elsőként jött létre, a mérőműszer felépítése egyszerű. A DTA működését a 2.4. ábra segítségével szemléltetjük.

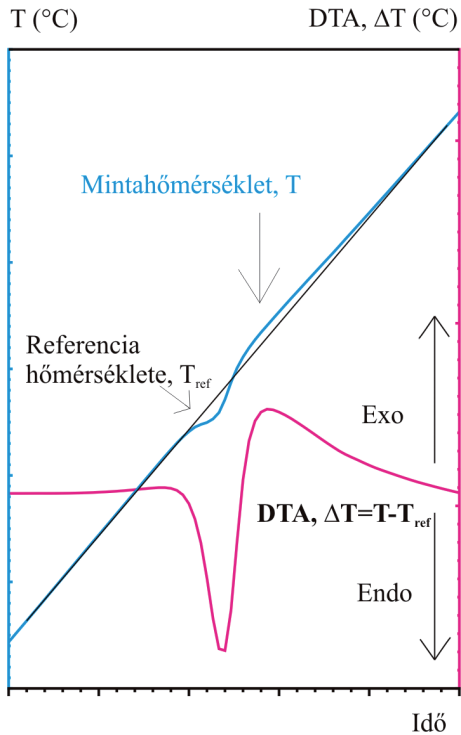
A kemencében egymással egyenértékű helyzetben két tégely van, az egyik a vizsgált mintához, a másik egy inert összehasonlító anyaghoz. A tégelyek vagy a kemence légterében helyezkednek el (ahogy az ábrán is látható), vagy egy fűtőtömbben, azzal közvetlenül érintkezve.



2.4. ábra. DTA-készülék vázolata: 1 - kemence, 2 - mintatartó a mintával, 3 - mintatartó a referenciaanyaggal, 4 - termoelemek érintkezési pontjai, 5 - mintahőmérséklet mérése, 6 - kiegyenlítő ellenállás, 7 - a DTA-jel mérése

A minta és az összehasonlító anyag hőmérsékletét egy-egy azonos típusú termoelem méri, a DTA-jelet pedig a két, szembekapcsolt termoelem eredő feszültsége adja. A DTA-jelet tehát közelítőleg arányos a minta és a referenciaanyag hőmérséklet-különbségével.

Ha a hőmérsékletprogram végrehajtása közben a mintában valamilyen endoterm átalakulás zajlik le, a minta hőmérséklete kisebb lesz, mint az összehasonlító anyagé; exoterm esetben pedig meghaladja azt. Így a látens hővel járó folyamatok a görbén egy-egy csúcsot adnak (2.5. ábra). Megállapodás szerint a DTA-jelet,  $\Delta T = T_{\text{minta}} - T_{\text{referencia}}$ , vagyis endoterm esetben az alapvonaltól lefelé tér ki a jel. Összehasonlító (más szóval referencia vagy inert) anyagnak általában olyan anyagot választanak, amely a kérdéses hőmérséklet intervallumban semmiféle változást nem szenved, pl.  $\alpha\text{-Al}_2\text{O}_3$ -ot.



2.5. ábra. A DTA-jel származtatása a minta és a referenciaanyag hőmérsékletéből, állandó fűtési sebesség esetén. A minta először megolvad, majd exoterm folyamatban bomlik

Tekintve, hogy a DTA-görbéken mind a kémiai reakciók, mind a fázisátalakulások és a kondenzált fázisokban lejátszódó szerkezeti változások jelentkeznek, a módszer – a rendelkezésre álló egyéb információkkal kiegészítve – igen jól használható a vizsgálati anyag hevítés hatására bekövetkező változásainak kvalitatív leírására. A különböző tudományos és gyakorlati alkalmazások azonban a minta által hő formájában felvett vagy leadott energia mennyiségi megismerését is igénylik, ez a DSC-technikával mérhető megbízhatóan.

A DTA-készülékeket két fő okból nem lehet pontos kalorimetriás mérésre használni. Egyrészt nem kellően állandók a kemence és a minta közötti hőátvitel feltételei. A 2.4. ábrán felvázolt elrendezésben például a hő a kemence belsejét kitöltő gázon át hővezetéssel és áramlással, valamint a kemence és a mintatartó között sugárzással megy át, s ezek igen érzékenyek a körülmények kis megváltozására is (a mintatartó kis elmozdulása, felületének állapota, az öblítőgáz minősége és áramlási

sebessége, stb.). Másrészt ahhoz, hogy a  $\Delta T$ -nek megfelelő feszültséget erősítés nélkül tudjuk mérni, a termoelemet viszonylag nagymennyiségű minta (100 mg - 1 g), ill. referenciaanyag belsejében kell elhelyezni. Így viszont a mért jel attól is függ, hogy mekkora a hőellenállás a mintatartó és minta között, illetve a mintán belül. (Ez utóbbi miatt nem hanyagolhatók el a mintán belüli hőmérséklet-különbségek sem.) E nehézségek következtében a DTA-csúcsok területéből számított átalakulási hő hibája gondos előkészítés és kalibráció után is meghaladja a 10, sokszor a 20%-ot.

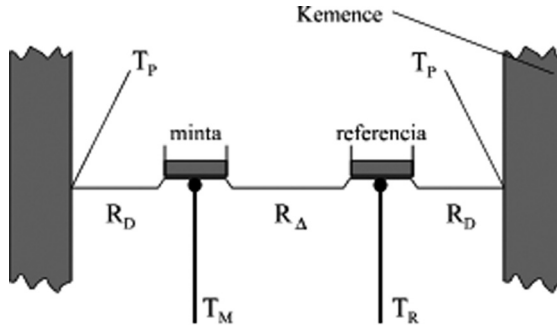
A kvantitatív kalorimetriás mérésekhez olyan módszerre van szükség, amely a fentiekben említett hátrányokat kiküszöböli, és így a hőáramok különbségével egyenesen arányos jelet ad, és ennek következtében a csúcsok területe is arányos lesz az átalakulási (látens) hővel. Ez a módszer a *differenciális pásztázó (szkenning) kalorimetria*, a *DSC*, melynek két, különböző elven alapuló, de gyakorlatilag – a felhasználás szempontjából – egyenértékű technikai megoldása létezik: a *hőáram (heat flux) DSC*, illetve a *teljesítménykompenzációs (power compensation) DSC*.

## 2.4.2. Hőáram-DSC és teljesítménykompenzációs DSC

A hőáram-DSC működési elve megegyezik a DTA-val: a jelet két szembekapcsolt termoelem szolgáltatja. A kemence és a mintatartó (ill. a referencia) tégely között azonban a hő döntő részét egy vízszintesen beépített fémkorong szállítja. A korong méretei és hővezetése szabják meg a hőellenállást, így az jól reprodukálható, s csak a cella hőmérsékletétől függ. A termoelemek érintkezési pontjai a korongon, a minta és a referencia tégely alatt vannak. A jel erősítése lehetővé teszi, hogy általában néhány mg tömegű mintát mérjünk, melyen belül már elhanyagolható a hőmérséklet-különbség. A referencia tégely többnyire üres.

A mért hőmérséklet-különbség és a minta jellemzőinek összefüggését kissé egyszerűsítve a 2.6. ábra alapján vizsgálhatjuk meg.

A kemence belső felületének hőmérséklete legyen a program szerinti,  $T_p$ . A minta- és a referenciatégely talpánál mérhető hőmérsékletet  $T_M$ , illetve  $T_R$  jelöli. A korong hőellenállását bontsuk három részre: a kemence és a tégelyek között  $R_D$ , a minta és a referenciatégely között  $R_\Delta$  a hőellenállás. A vizsgált anyagot tartalmazó tégely a kemencével és a referenciatégellyel cserélhet hőt, a tégely felé mutató hőáram pedig a tégelyt és a mintát melegíti, illetve átalakulás esetén annak látens hőjét fedezi.



2.6. ábra. A hőáram-DSC vázolata

Így a tégely felé mutató hőáram:

$$\dot{Q}_M = \frac{T_P - T_M}{R_D} + \frac{T_R - T_M}{R_D} = C_M \frac{dT_M}{dt} + \frac{dh}{dt}, \quad (2.1)$$

ahol  $C_M$  a tégely és a minta együttes hőkapacitása,  $t$  az idő és  $h$  az átalakuláshoz kapcsolódó entalpiaváltozás. Hasonló kifejezés írható föl a referenciaoldalra is, de ott látens hővel nem kell számolni:

$$\dot{Q}_R = \frac{T_P - T_R}{R_D} + \frac{T_R - T_M}{R_D} = C_M \frac{dT_R}{dt}. \quad (2.2)$$

Mivel a mért hőmérséklet-különbség  $\Delta T = T_M - T_R$ , a fenti két egyenletben szereplő időderiváltak összefüggése:

$$\frac{dT_M}{dt} = \frac{dT_R}{dt} + \frac{d(\Delta T)}{dt}. \quad (2.3)$$

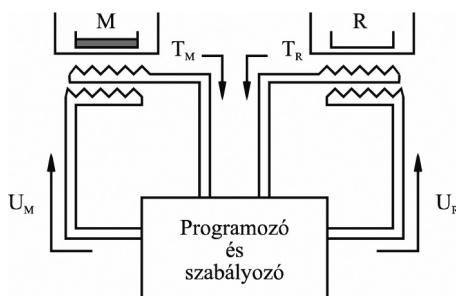
Ha (2.3) jobb oldalának első tagját a program szerinti fűtési sebességgel ( $\beta$ ) tekintjük egyenlőnek, majd a (2.3) összefüggést a (2.1) egyenletbe behelyettesítjük, és kivonjuk belőle a (2.2) összefüggést, a következő eredményre jutunk:

$$-\frac{\Delta T}{R_D + 1/2R_D} = \dot{Q}_M - \dot{Q}_R = \frac{dh}{dt} + (C_M - C_R)\beta + C_M \frac{d(\Delta T)}{dt}. \quad (2.4)$$

Tehát a minta- és referenciaoldal hőáramának különbsége egyfelől arányos a mért hőmérséklet-különbséggel, másfelől három tag összegeként fogható fel. Ezek közül az első a látens hővel, a második a hőkapacitások különbségével függ össze. A harmadik, tranziens tag lassú változások esetén elhanyagolható, ha pedig a csúcs kezdetétől a végéig integrálunk, ez a tag közelítőleg zérust ad gyors átalakulások (pl. tiszta anyag olvadása) esetén is. A DSC-görbék tehát lehetővé teszik mind az átalakulási hő

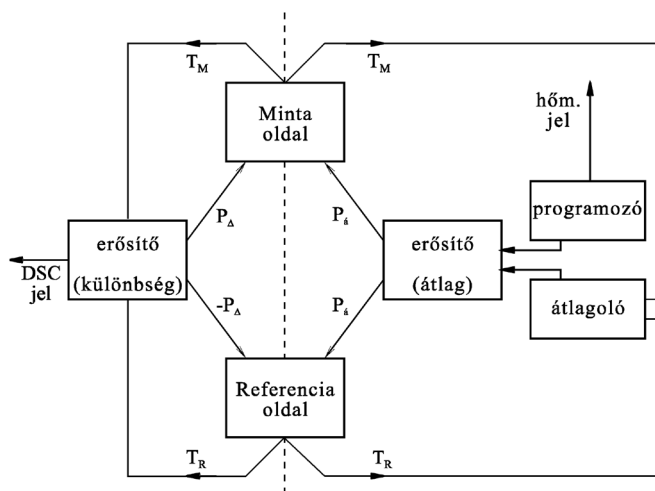
(látens hő), mind a hőkapacitás (s ebből a fajhő) meghatározását. Az előbbi a csúcsterületből, az utóbbi az alapvonal eltolódásából számítható, megfelelő kalorimetrikus kalibráció után. A DSC-készülékek hőmérsékleti és kalorimetriás kalibrációjának, valamint a hőkapacitás mérési eljárásának leírása a termikus analízis kézikönyveiben megtalálható.

A differenciális pásztázó kaloriméterek másik típusában, a *teljesítménykompenzációs DSC-ben* (2.7. ábra) a minta és a referencia tere el van különítve.



2.7. ábra. Teljesítménykompenzációs DSC-készülék elvi vázlatja

A tégelyek alatt egy-egy ellenállás-hőmérő és egy-egy fűtőellenállás helyezkedik el. A két oldal fűtőfeszültségét a szabályozó úgy változtatja, hogy egyrészt megvalósuljon a hőmérsékletprogram, másrészt kiegyenlítődjön a hőmérséklet-különbség. Éppen a pontos kiegyenlítés végett használnak ellenállás-hőmérőt, amely a kis eltéréseket a termoelemeknél megbízhatóbban méri.



2.8. ábra. Teljesítménykompenzációs DSC-készülék szabályozó körei



A teljesítménykompenzációs DSC-ben két szabályozó kör van, ezeket a 2.8. ábrán egy szaggatott vonal választja el. A fűtőtelsítmény egyik komponensét ( $P_{\Delta}$ ) a program szerinti hőmérséklet és a két oldal átlaghőmérséklete közötti különbség alapján szolgáltatja a készülék. A másik szabályozókör a két oldal hőmérséklet-különbsége alapján működik, s az ennek megfelelő teljesítménykomponens ( $P_{\Delta}$ ) a hidegebb oldal fűtőtelsítményét növeli, a másikat csökkenti. A DSC-jel a két eredő fűtőtelsítmény különbsége.

Ha feltételezzük, hogy a két oldal tökéletesen egyforma, akkor a fűtőtelsítmények különbsége egyenlő a minta-, ill. a referenciátégely felé irányuló hőáram különbségével.

$$\Delta P = \dot{Q}_M - \dot{Q}_R = \frac{dh}{dt} + (C_M - C_R) \beta \quad (2.5)$$

Mind a hőáram-, mind a teljesítménykompenzációs DSC-cellák kalibrációs tényezőjét általában tiszta fémek, illetve vízjég olvadási görbéiből határozzák meg. A kalibrációs tényező az együtthatója a mért jel és a hőáramkülönbség, valamint a csúcs alatti terület és az átalakulási hő közötti összefüggésnek. A hőáram-DSC-k kalibrációs tényezője hőmérsékletfüggő; ezt a változást a készülékek általában elektronikusan kiegyenlítik.

A 90-es években fejlesztették ki a modulált hőmérsékletű DSC-méréstechnikát (Modulated Temperature DSC, MTDSC), mely mindkét készüléktípussal megvalósítható. Ennek alapjait az amorf anyagok DSC-vizsgálatához kapcsolódóan tekintjük át, egy, a gyógyszerkutatásból vett alkalmazási példát is bemutatva.

### 2.4.3. Polimorfia vizsgálata

Ha egy vegyületnek több, különböző kristályszerkezetű szilárd formája, módosulata van, polimorfiról beszélünk. A polimorfia igen gyakori jelenség mind a szervetlen, mind a szerves vegyületek világában. A szerkezeti különbségek természetesen jelentkeznek a különböző fizikai és kémiai tulajdonságok eltéréseiben is.

Bár a gyógyszerek hatóanyagai a testnedvekben oldva fejtik ki hatásukat, a készítményekben a szilárd állapotú anyagok polimorfija több szempontból is fontos:

- a kristályszerkezet befolyásolja az oldhatóságot és az oldódás sebességét (tehát a biológiai hozzáférhetőséget), ennek különösen a vízben rosszul oldódó vegyületek esetében van jelentősége;

- a módosulatok stabilitása, bomlékonysága, reakciókészsége számottevően eltérhet;
- iparjogvédelmi szempontból ugyanazon vegyület polimorf módosulatai külön anyagnak minősülnek, így üzleti érdekből is fontos a polimorf formák ismerete.

Tekintsük először át a polimorfia termodinamikai hátterét. A fázisok stabilitását, a közöttük kialakuló egyensúlyi viszonyokat (adott hőmérsékleten és nyomáson) a szabadentalpia,  $G$  jellemzi:

$$G = H - T \cdot S, \quad (2.6)$$

ahol  $H$  az entalpia,  $S$  az entrópia és  $T$  az abszolút hőmérséklet. Két polimorf módosulat közötti egyensúly lehetőségét *Gibbs* fázistörvénye segítségével vizsgálhatjuk meg:

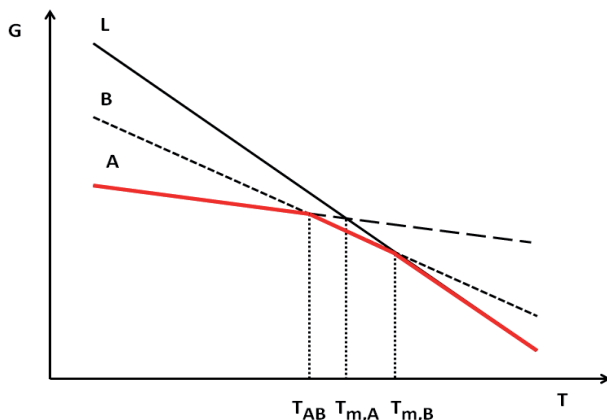
$$SZ = K - F + 2 = 1 - 2 + 2 = 1, \quad (2.7)$$

melyben  $SZ$  a szabadsági fok,  $K$  a komponensek, ill.  $F$  az egyensúlyi fázisok száma. Esetünkben a szabadsági fok 1, ami azt jelenti, hogy adott nyomáson a két szilárd módosulat legfeljebb egy hőmérsékleten tarthat egyensúlyt; azt azonban, hogy különböző nyomásokon és hőmérsékleten összesen hány módosulat jöhet létre, a fázistörvény nem korlátozza.

A termodinamika a kristályos módosulatok közötti átalakulás lehetőségéről is felvilágosítást ad. Két módosulat ebből a szempontból enantiotróp vagy monotróp viszonyban állhat. A következőkben A-val jelöljük a kisebb energiájú, kis hőmérsékleteken stabilisabb formát, B-vel pedig a nagyobb energiájú, kis hőmérsékleteken kevésbé stabilis formát. Enantiotrópia esetén a stabilitási sorrend függ a hőmérséklettől, a módosulatok közötti szilárd-szilárd átalakulás a hőmérséklettől függően mindkét irányban önként (spontán módon) végbemehet. Ha a rendszer monotróp, az A forma a teljes hőmérséklet-tartományban stabilisabb, önként csak a  $B \rightarrow A$  átalakulás játszódhat le. Hangsúlyozzuk, hogy az átalakulások lejátszódásának nemcsak termodinamikai, hanem kinetikai feltételei is vannak – így gyakran előfordul, hogy termodinamikai szempontból kevésbé stabilis módosulat a nagy aktiválási energiagát miatt hosszú (akár gyakorlatilag korlátlan) ideig fennmaradhat.

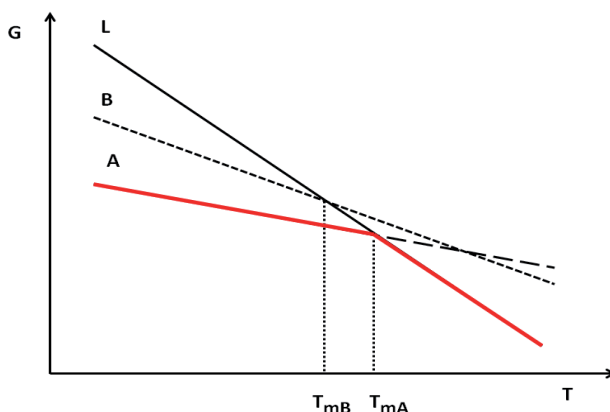
A következő sematikus ábrák segítségével először a két polimorf módosulattól álló rendszerek termodinamikáját, majd DSC-görbéik lehetséges típusait tárgyaljuk.<sup>4</sup> Az egyszerűség kedvéért az ábrákon a  $G - T$  függvényeket egyenesekként jelenítettük meg. A használt jelölések:  $T$  a hőmérséklet,  $H$  az entalpia,  $G$  a szabadentalpia; „A” a kisebb energiájú forma, kis hőmérsékleteken mindenképp ez a stabilabb; „B” a nagyobb

energiájú forma, kis hőmérsékleteken ez a kevésbé stabil; „L” a folyadék (olvadék);  $\Delta H$  a fázisátalakulási hő (olvadás, szilárd-szilárd átalakulás); „m” az olvadásra utal; „AB” a két forma közötti szilárd-szilárd átalakulásra utaló index.



2.9. ábra. Enantiotróp rendszer sematikus szabadentalpia–hőmérséklet diagramja

A 2.9. és 2.10. ábrákon az A és B kristályos módosulatok mellett a folyadék (olvadék) szabadentalpia–hőmérséklet függvényét is ábrázoltuk. Tekintve, hogy a termodinamikai stabilitás kritériuma a szabadentalpia minimuma, látható, hogy enantiotróp rendszerben a kis hőmérsékletektől elindulva először az A, majd a B módosulat, végül a folyadék stabilis. A  $T_{AB}$  hőmérsékleten a két szilárd forma egyensúlyban van, míg  $T_{m,A}$ , illetve  $T_{m,B}$  a módosulatok olvadáspontja.

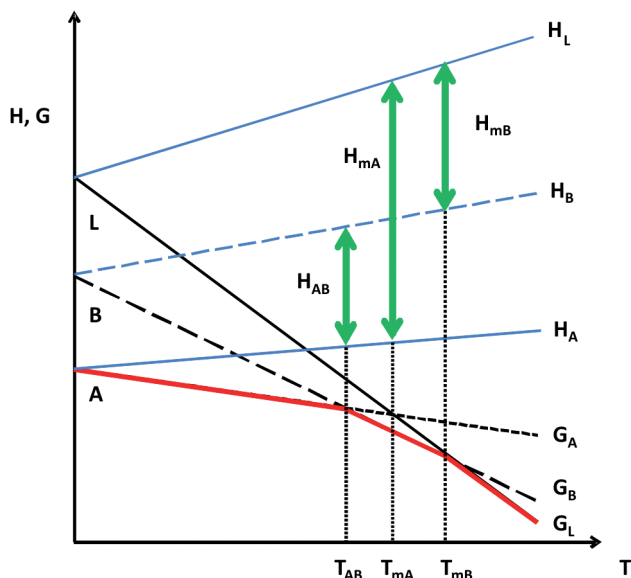


2.10. ábra. Monotróp rendszer sematikus szabadentalpia–hőmérséklet diagramja

A szaggatott vonalakkal azt jelezzük, hogy metastabilis fázisként kis hőmérsékleteken a B forma, a  $T_{AB}$  egyensúlyi hőmérséklet felett az A forma, a B módosulat olvadáspontja alatt pedig túlhűtött folyadék létezik.

Monotróp rendszerben csak az A módosulat és – annak olvadáspontja felett – az olvadék stabilis, a B forma és a túlhűtött olvadék lehet metastabilis. Az A forma olvadáspontján kívül egyensúly alakulhat ki a szilárd B és az olvadék között is  $T_{m,B}$  hőmérsékleten.

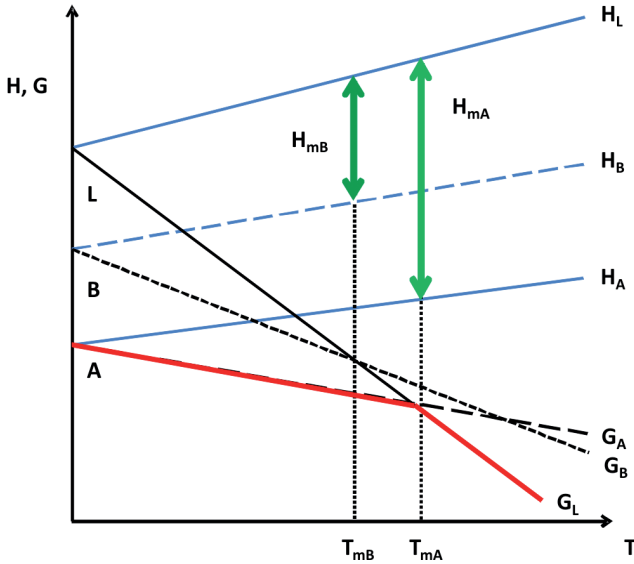
A fentiekből kiindulva a következő ábrákon azt szemléltetjük, hogy milyen látenshő-értékek tartoznak a stabilis, illetve a metastabilis fázisok között lehetséges átalakulásokhoz az egyensúlyi hőmérsékleteken.



2.11. ábra. Az egyensúlyi hőmérsékletekhez tartozó átalakulási hőek enantiotróp rendszerben

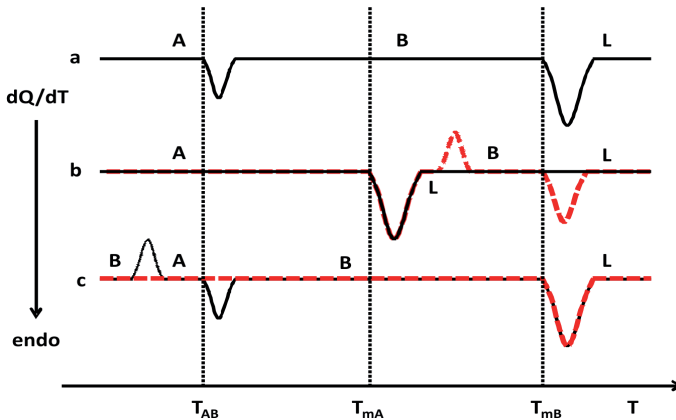
Látható, hogy enantiotrópia esetében a magasabb olvadáspontú forma olvadáshője a kisebb, míg monotrópia esetében ez a nagyobb, ami gyakran használható a rendszer jellegének eldöntésére (2.11. és 2.12. ábra).

Az egyensúly körülményei között az átalakulások természetesen mindkét irányban lejátszódhatnak, míg az egyensúlyi hőmérséklettől eltávolodva csak az instabil  $\rightarrow$  stabil átalakulás mehet végbe önként. Az pedig, hogy a termodinamikailag megengedett spontán átalakulások valóban megtörténnek-e, kinetikai hatásokon múlik. Mindezt figyelembe véve, Giron<sup>4</sup> gondolatmenetét követve áttekinthetjük, hogy milyen hevítési DSC-görbéket kaphatunk két polimorf módosulatból álló rendszerekben.



2.12. ábra. Az egyensúlyi hőmérsékletekhez tartozó átalakulási hő monotróp rendszerben

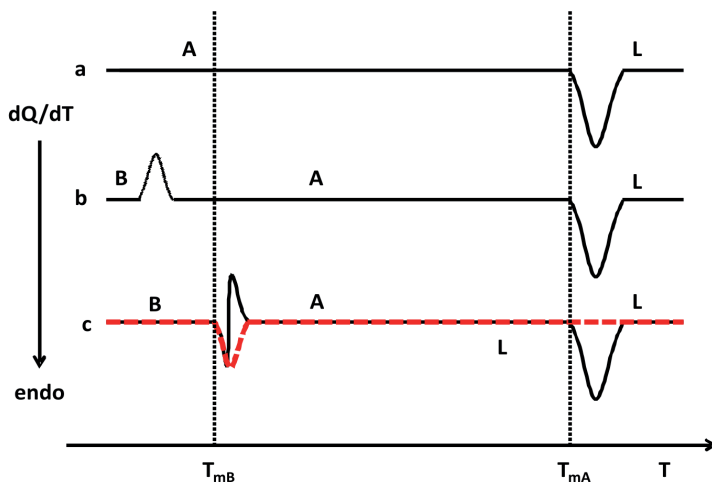
Az alábbi görbéken már nemcsak a termodinamikailag stabilis fázisok jelennek meg, hanem a metastabilisak is.



2.13. ábra. Sematikus DSC-görbék enantiotróp rendszer esetén

Enantiotróp viszony esetén mind a szilárd-szilárd átalakulás, mind a nagyobb hőmérsékleten stabilis forma olvadása megtörténhet az egyensúlyi hőmérsékletén, pontosabban annak közvetlen közelében, ahogy azt a 2.13. ábra *a* görbéje mutatja. Ha az  $A \rightarrow B$  átalakulás gátolt (*b*), az A forma elérheti az olvadáspontját (középső görbék). Az itt kialakuló

olvadék vagy megmarad az egész hőmérséklettartományban, vagy a B forma kristályosodik ki belőle exoterm folyamatban, annak olvadáspontja alatt (akár az első olvadás megindulása után közvetlenül), amit követően egy második olvadási csúcs jelenik meg. Végül ha a kis hőmérsékleten metastabilis B formát melegítjük (*c*), az vagy fennmarad egészen a B forma olvadáspontjáig, vagy átalakulhat az A formává, a  $T_{AB}$  egyensúlyi hőmérséklet alatt. Az utóbbi esetben a DSC-görbe az *a* vagy *b* bármelyik esetének megfelelően folytatódhat, az ábrán ebből az *a* esetnek megfelelő menet szerepel.



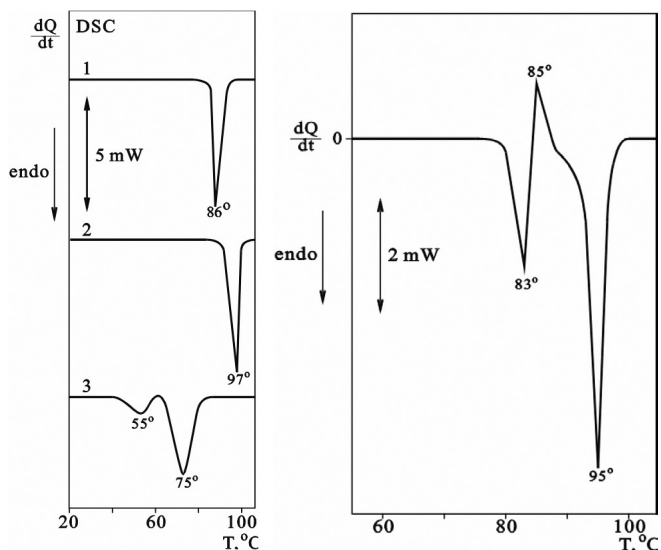
2.14. ábra. Sematikus DSC-görbék monotróp rendszer esetén

Monotróp rendszerben, ha a stabilis módosulatot melegítjük, csak ennek olvadása látható a DSC-görbén (2.14. ábra, *a* görbe). Ha a metastabilis módosulattól indulunk ki, az – olvadáspontja alatt – átalakulhat a stabilis formává (2.14.*b*). Ha ez nem történik meg, akkor a B módosulat olvadása után vagy nem történik további átalakulás, vagy kikristályosodik az A, ami később megolvad (2.14.*c*).

Hűtési DSC-görbék esetében még többféle görbét kaphatunk, hiszen ekkor a folyadék esetleges túlhűtésével is számolnunk kell.

Példaként a szorbit polimorf módosulatainak viselkedését és a szorbitolvadék beoltásos kristályosításának modellezését mutatjuk be. A 2.15. ábra bal oldalán a két kristályos módosulat és a megdermedt, csak részlegesen rendezett olvadék DSC-felvételei láthatók. Jobbra az A és B módosulat 1:1 arányú keverékének lassú fűtéssel felvett görbéjét mutatjuk be. Itt az A forma olvadása indul meg, az olvadék azonban a jelenlévő szilárd B módosulattal érintkezve azonnal kristályosodik az utóbbi

formában. Végül az egységes B forma olvadási csúcsa jelenik meg. Ezek az eredmények egy új olvadékkristályosítási technológia kifejlesztésében hasznosultak.<sup>5</sup>



2.15. ábra. A szorbit kristályos módosulatainak, valamint az A és B forma 1:1 keverékének olvadása

DSC-vizsgálatok segítségével tehát sok információ szerezhető arról, hogy adott anyagnak léteznek-e polimorf módosulatai, s ha igen, ezek milyen viszonyban vannak egymással és milyen átalakulásokat mutatnak (itt még egyszer utalunk a metastabilis fázisok előfordulásának lehetőségére). Gyakran a DSC-vizsgálat alapján vetődik fel, hogy polimorf rendszerrel van dolgunk. Emiatt a polimorfia vizsgálatában a módszer – méltán – nagyon elterjedt. Az eredmények megbízható értelmezéséhez azonban a szerkezeti vizsgálatok (XRD, IR- és Raman-spektroszkópia) elengedhetetlenek. Hasznos az átalakulások mikroszkópi megfigyelése fűthető tárgyasztalon. Célszerű mindig felvenni a rendszer TG-görbéjét is, hogy nincs-e tömegváltozás a vizsgálat hőmérséklet-tartományában.

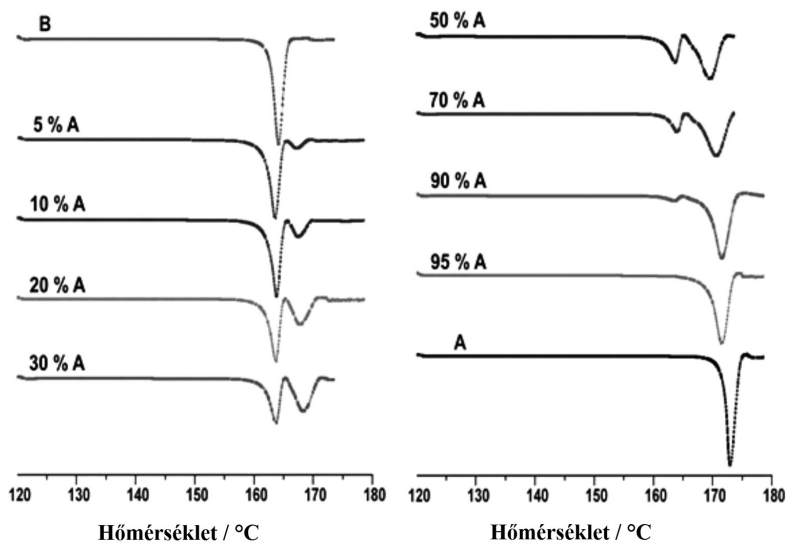
### 2.4.3.1 Polimorf módosulatok mennyiségi mérése

A módosulatok olvadási hője, illetve a szilárd fázisok közötti átalakulások hője alapján keverékekben DSC segítségével sok vegyület esetében mérhetjük az egyes formák mennyiségét, illetve egymáshoz viszonyított arányát. Ehhez az adott fázisátalakulás (olvadás, szilárd-

szilárd módosulatváltozás) mért átalakulási hőjét a tiszta módosulat értékéhez kell viszonyítanunk. A mennyiségi elemzés termodinamikai alapjai egyszerűek, a DSC-mérések gyorsan végrehajthatók, és gyakran megfelelő az egyes formák kimutatási határa és az érzékenység is.

A polimorf módosulatok mennyiségi méréséhez azonban ellenőriznünk kell, hogy az adott rendszerben megbízhatóan működik-e a módszer. Ahogy az előbb láttuk, mind az enantiotróp, mind a monotróp rendszerekben különféle DSC-görbéket kaphatunk attól függően, hogy az átalakulások a termodinamikai egyensúly közelében játszódna-e le, vagy a kinetikai tényezők jelentősen befolyásolják azok hőmérsékletét. Erre a mátrix is hatással lehet, ha nemcsak egyazon anyag formáinak keverékéről van szó. Az ellenőrzéshez mindenképp hozzá kell tartoznia más, a kristályszerkezettel közvetlenül összefüggő módszerrel (XRD, IR, Raman) való összehasonlításnak. A következő példa is ezt támasztja alá.

Német és munkatársai a famotidin esetében vizsgálták meg a módosulatkeverékek mennyiségi elemzési lehetőségeit, valamint a nyomás, az őrlés és a mikronizálás hatását a formák egymás közötti átalakulására. Az összehasonlításban a röntgendiffrakciót és a Raman-spektroszkópiát használták.<sup>6</sup>



2.16. ábra. Famotidin A + B keverékek DSC-görbéi<sup>6</sup>

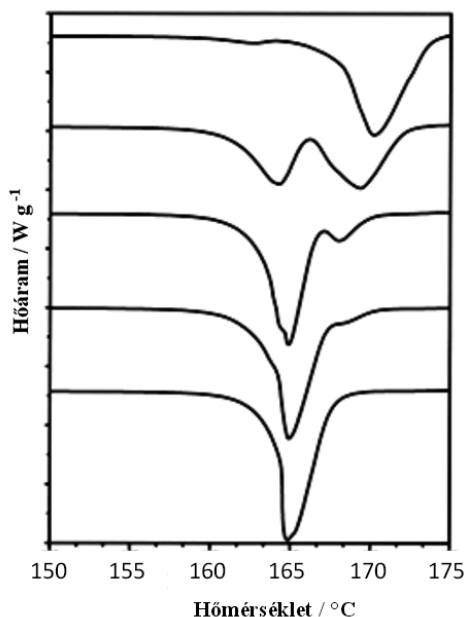
A famotidin két módosulata monotróp rendszert alkot, az A forma stabil (op. 170,6 °C), a B metastabil (op. 162,9 °C); a *Quamatel* tabletta (Richter) az utóbbit tartalmazza. Kristályosítással mindkét forma tisztán előállítható.



A vizsgálatok – a keverékek megfelelő mennyiségi elemzési módszerének (vagy módszereinek) kiválasztásán és optimalizálásán túl – választ kerestek arra a kérdésre, hogy a nagy nyomás (préselés), az őrlés, illetve a mikronizálás hatására lejátszódik-e a  $B \rightarrow A$  átalakulás. Keverékekben az A módosulatra nézve a DSC adta a legjobb kimutatási határt (0,5%), tehát ez látszott a legalkalmasabbnak a B forma tisztaságának igazolására.

A két módosulat keverékeinek DSC-görbéit láthatjuk a 2.16. ábrán. Szembetűnő, hogy míg a kis A-tartalmú keverékekben jól látható a forma olvadási csúcsa, a B komponensről ez nem mondható el. A csúcsok területarányából számítva az A hányada a beméréshez képest nőtt, tehát a felvétel közben a metastabil forma egy része átalakult a stabil módosulattá, ha az utóbbi a keverékben jelen volt. (Ezt a növekményt, ha reprodukálható, természetesen figyelembe lehetne venni a kalibrációban.)

A 2.17. ábra a nyomás hatását vizsgáló méréssorozat eredményét mutatja. A kiindulási anyag tiszta B volt, ezt különböző nyomáson préselték, majd felvették a minták olvadási görbéit. Az A módosulat endoterm effektusa már a 100 MPa nyomáson kezelt mintában megjelent, 800 MPa esetén pedig csaknem teljesnek tűnik az átalakulás.<sup>7</sup> A röntgendiffrakció és a Raman-spektroszkópia ezt azonban egyáltalán nem igazolta: valamennyi préselt keverék változatlanul tiszta B kristályszerkezetű volt.<sup>8</sup>



2.17. ábra. A nyomás hatásának vizsgálata a famotidin módosulatváltozására. Alulról felfelé a nyomás 0,1; 100; 200; 400 és 800 MPa<sup>8</sup>

Hasonló eredmények születtek az őrlés és a mikronizálás hatásának vizsgálatában is.<sup>9</sup> A tapasztaltakat a nyomás, az őrlés és a mikronizálás mechanikai aktiváló hatásával lehetett megmagyarázni: a kezelés közben létrejött aktivált góccok a DSC-mérés közben indították meg a szilárd-szilárd átalakulást, melyben a stabil forma létrejött.<sup>6</sup> A DSC ebben az esetben is részletes felvilágosítással szolgált a polimorf átalakulásokról, ugyanakkor megmutatkozott az is, hogy a termoanalitikai mérés közben létrejöhet olyan fázis, amely eredetileg nem volt jelen a vizsgált anyagban.

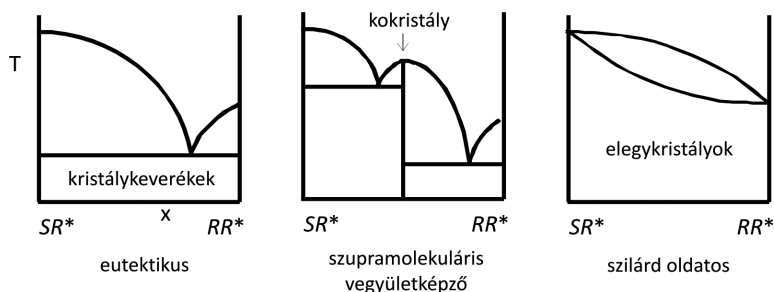
#### 2.4.4. Fázisdiagramok felvétele DSC-mérések alapján. A termikus analízis alkalmazása királis vegyületek elválasztásának tervezésében

A szilárd-folyadék fázisdiagramok jól használhatók

- több kémiai komponensből álló rendszerek viselkedésének, a komponensek közötti kölcsönhatásoknak a jellemzésében, továbbá
- frakcionált kristályosításon, illetve oldáson alapuló elválasztási módszerek tervezésében és optimalizálásában.

A folyékony halmazállapotban korlátlanul elegyedő kétkomponensű rendszerek szilárd-folyadék (szilárd-olvadék) fázisdiagramjai három alaptípusra épülnek.

Ha a komponensek szilárd fázisban egyáltalán nem elegyednek, az olvadék hűtésével a két komponens tiszta kristályainak keverékéhez jutunk. Ha ezt a kristálykeveréket melegítjük, az eutektikus hőmérsékleten megjelenik a folyadékfázis (2.18. ábra, bal oldali diagram).



2.18. ábra. Sematikus szilárd-olvadék fázisdiagramok: eutektikus, molekulavegyületet, illetve szilárd oldatot tartalmazó rendszer

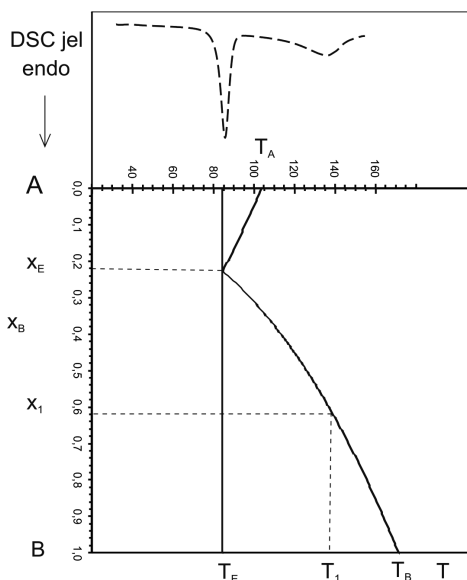
E hőmérséklet felett általában az egyik komponens tiszta kristályai és az adott komponensre nézve telített oldat tartanak egyensúlyt, egészen addig, amíg el nem érjük az adott szilárd fázis teljes beoldódását, ahol a szilárd

fázis eltűnik. Ha a rendszer eutektikus összetételű, akkor az eutektikus ponton egységesen, szilárd maradék nélkül olvad meg.

A szilárd állapotban is korlátlanul elegyedő kétkomponensű rendszerek fázisdiagramján (jobb oldali diagram) kis hőmérsékleteken a szilárd oldat (elegykristály) területét találjuk, előlött helyezkedik el a kétfázisú tartomány, melyen belül az egyik komponensre nézve telített elegykristály tart egyensúlyt a másakra nézve telített (folyékony) oldattal.

A két komponens szilárd molekulavegyületet – kokristályt – is képezhet, mely önálló fázisként jelenik meg. A 2.18. ábra középső diagramja olyan rendszernek felel meg, amelyen belül a molekulavegyületben a két komponens molaránya 1:1, és szilárd állapotban egyik komponens sem elegyedik a molekulavegyülettel; a fázisdiagram így két eutektikus rendszerből áll.

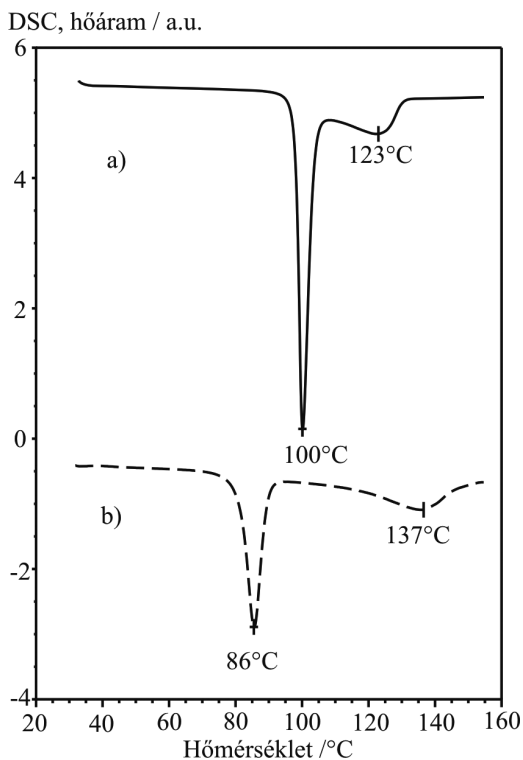
DTA- és DSC-mérések alapján kétkomponensű rendszerek szilárd-folyadék fázisdiagramját is fel lehet venni.



2.19. ábra. Fázisdiagram felvétele DSC-vel vagy DTA-val

A 2.19. ábra alsó részén egy eutektikus típusú fázisdiagram (az előzőhöz képest derékszögben elforgatva), felső részén az  $x_1$  összetételnek megfelelő DTA-/DSC-görbe található, a két csúcs az eutektikum megolvadásához, illetve a visszamaradt szilárd B anyag feloldódásához tartozik. A fázisdiagram kimérhető megfelelő számú keverékkel, illetve közelítőleg számítható a tiszta komponensek olvadáspontjából és olvadáshőjéből.<sup>10,11</sup> A 2.20. ábra két eutektikus rendszer olvadását mutatja

be.<sup>12</sup> Mindkét görbén élesen jelenik meg az eutektikum olvadása, majd a szilárd maradék oldódása a folyadékfázisban, ahogy azt sematikusán bemutattuk a 2.19. ábrán.

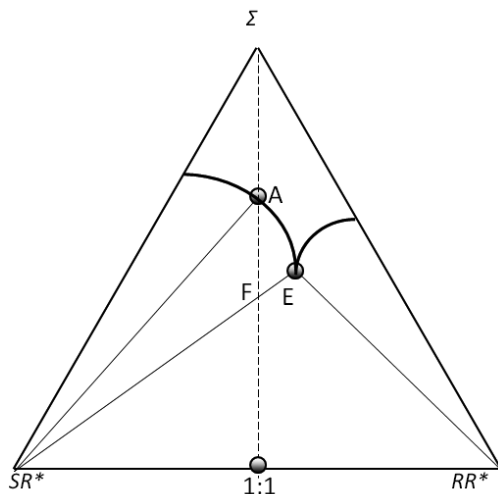


2.20. ábra. Olvadási DSC-görbék két eutektikus rendszerben<sup>12</sup>

Az enantiomerek (optikai izomerek) elválasztásának mindmáig legelterjedtebb módszere, hogy a két izomerből egy enantiomertiszta rezolváló ágenssel diasztereomereket (leggyakrabban sókat) hoznak létre, ezeket frakcionált kristályosítással választják el, majd a diasztereomerből kinyerik az enantiomert. Az elválasztás várható hatékonyságát a két diasztereomerből és az oldószerből álló háromkomponensű rendszer oldhatósági fázisdiagramjából becsülhetjük.<sup>13</sup> A következő gondolatmenet eutonikus (eutektikus) rendszerre vonatkozik, amikor szilárd állapotban nincs a komponensek között elegyedés.

A fázisdiagram egy izotermáját sematikusán a 2.21. ábra mutatja be. A tiszta oldószert  $\Sigma$  jelöli. A háromszögdiagram felső tartományát az oldatfázis foglalja el. A tartomány alsó határa az egyik, illetve a másik diasztereomerre nézve telített oldat. Az ábra szerinti rendszerben az  $SR^*$

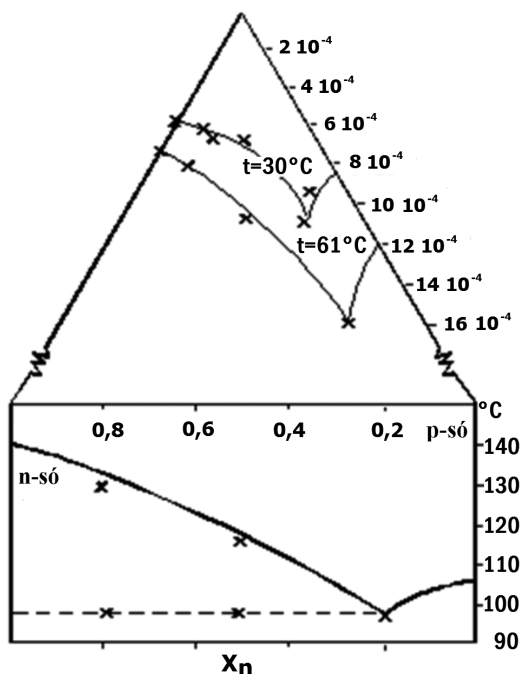
diasztereomer oldódik kevésbé; ha racém összetételű oldatból indulunk ki, ennek a kristályosodása indul meg először. Az oldatból a tiszta  $SR^*$  diasztereomer válik ki mindaddig, amíg el nem érjük az E pontot, a rendszer eutonikus (eutektikus) pontját. Ha tovább folytatjuk a kristályosítást, a termék a két diasztereomer kristályaink keveréke lesz. Tehát az E pont határozza meg a termodinamikailag lehetséges legjobb elválasztást. Az oldhatósági diagramok felvétele – különböző hőmérsékleteken – igen sok munkát és időt igényel.



2.21. ábra. Oldhatósági izoterma

Jacques és munkatársai mutattak rá a két diasztereomerből álló rendszer szilárd-olvadék fázisdiagramjának használhatóságára a rezolváló ágens kiválasztásában és az eljárás optimalizálásában.<sup>14</sup> A két fázisdiagram ugyanis általában azonos típusú (tehát példánkban a két diasztereomer eutektikus rendszert alkot). A két diasztereomer aránya a különböző hőmérsékletekhez tartozó eutonikus pontokban pedig jó közelítéssel megegyezik a kétkomponensű rendszer eutektikus összetételével, amire konkrét példát a 2.22. ábra mutat.<sup>15</sup>

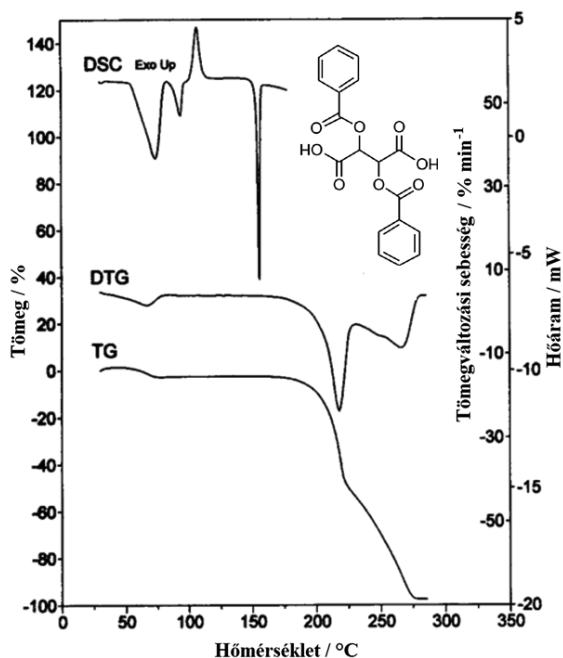
A háromszögdiagramon feltüntetett oldhatósági izotermák eutonikus pontjait a felső csúcsponttal (tiszta oldószer) összekötve kapott egyenes mentén a két diasztereomer só aránya azonos. Ahol ez az egyenes eléri a vízszintes tengelyt, a rendszer kétkomponensűvé válik, az összetétel megfelel az eutektikusnak. Így a kétkomponensű rendszer vizsgálata alapján előre tudtuk jelezni az elválasztás hatékonyságát, amit számos esetben sikerrel alkalmaztunk konkrét rezolválási eljárások tervezésében.<sup>16</sup>



2.22. ábra. A biner és terner fázisdiagram összefüggése

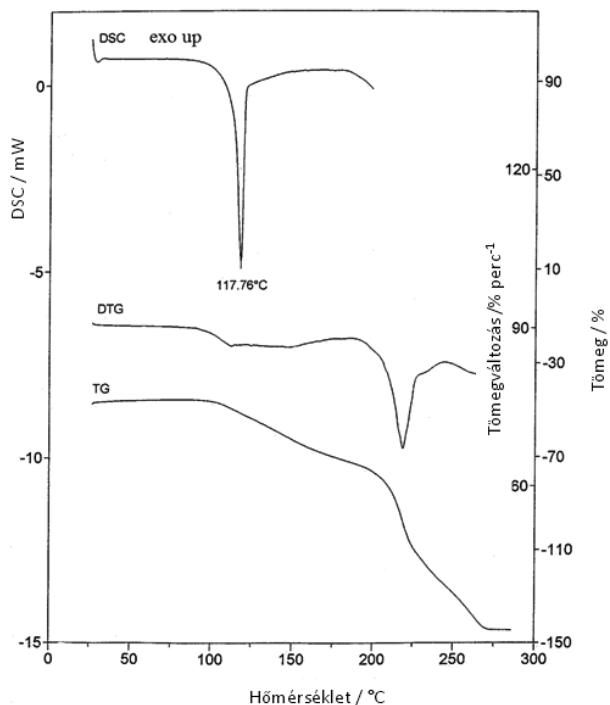
A következő példa – mely szintén a rezolváláshoz kapcsolódik – a különböző termoanalitikai mérés technikák és a szerkezetvizsgálat együttes alkalmazásának előnyeit kívánja kiemelni. Az optikailag aktív borkősavat és származékait – így az *O,O'*-dibenzoil-(2*R*,3*R*)-borkősavat (DBBS) – gyakran használják enantiomerek rezolválására.

A 2.23. ábrán a DBBS-monohidrát TG-, DTG- és DSC-görbéi láthatók. Az 50 és 80 °C közötti tömegvesztés (ld. a TG- és DTG-, valamint a DSC-görbét) a víztartalom elvesztését jelzi. (A TG-lépcső magassága egyébként azt mutatja, hogy az adott minta esetén a víz mennyisége az elméletinél kisebb volt.) A vízmentes vegyület tömegcsökkenése 180 °C felett indul meg. A vízvesztés és a DBBS bomlása között azonban a DSC-görbe több átalakulást is jelez. A 90 °C feletti endoterm csúcs a hidrat-kristályszerkezet összeomlásához, az ezt követő exoterm effektus a vízmentes DBBS kristályainak kialakulásához, a 156 °C-os csúshőmérsékletű éles endoterm csúcs a vízmentes anyag olvadásához rendelhető. A TG- és DSC-görbék mellett az előző megállapításokhoz fűtött tárgyasztalú mikroszkópiás és röntgendiffrakciós vizsgálatokat is felhasználtunk.<sup>17</sup>



2.23. ábra. Dibenzoilborkősav-monohidrát TG-, DTG- és DSC-görbéje. Az első, 0,51%-os tömegcsökkenés egy molekula víznek felel meg. A vízmentes vegyület bomlása 180 °C körül indul!<sup>17</sup>

Az optikailag aktív DBBS többek között királis alkoholok rezolválásához is használható; a DBBS–alkohol diasztereomer szupramolekuláris vegyület formájában kristályosodik. A termogravimetriás vizsgálatokkal tisztázható volt e vegyületek sztöchiometriája. A 2.24. ábrán a DBBS és a mentol szupramolekuláris vegyületének viselkedését mutatjuk be. Az alkohol távozása kb. 80 °C-tól figyelhető meg, majd – mielőtt ez befejeződne – 180 °C körül megindul a DBBS bomlása. 118 °C-on a szupramolekuláris vegyület olvadása jelentkezik. A DBBS – királis alkohol vegyületek egykristály-röntgendiffrakciós vizsgálata 1:1 arányt adott, a polikristályos anyag TG- görbéinek értékelése közelítőleg ugyanezt az arányt mutatta. Érdekes, hogy az akirális helyettesített ciklohexanolokkal az arány 1:2-nek adódott.<sup>18,19</sup> Az optikailag aktív DBBS a mentollal (és más, hasonló szerkezetű királis alkoholokkal) enantioszelektíven alkot szupramolekuláris vegyületet,<sup>20</sup> melyre alapozva Kozma és munkatársai új rezolválási eljárást dolgoztak ki.<sup>21</sup>



2.24. ábra. DBBS–mentol szupramolekuláris vegyület termikus átalakulása

Szupramolekuláris vegyületek vizsgálatára további példákat a kapcsolt módszerekről szóló fejezetben tárgyalunk.

### 2.4.5. Amorf anyagok vizsgálata. Modulált hőmérsékletű differenciális pásztázó kalorimetria (MTDSC)

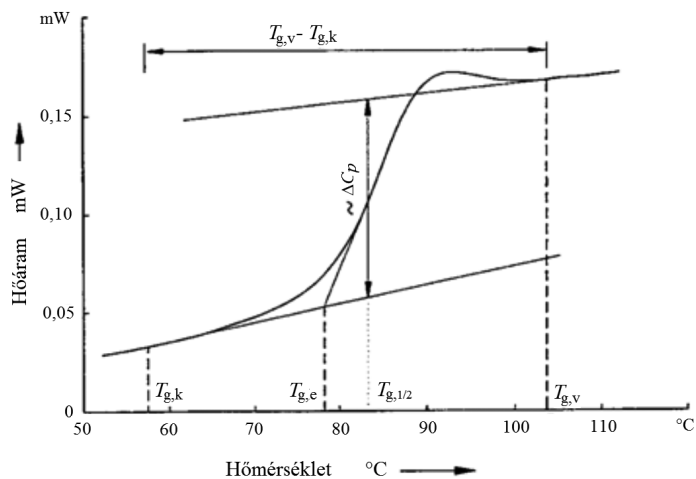
Az amorf szilárd anyagok (illetve amorf-kristályos keverékek) DSC-vizsgálata a mesterséges polimerek, műanyagok körében nélkülözhetetlen mind a fejlesztés, mind a minőségbiztosítás szempontjából – ez a terület a DSC-mérések egyik legnagyobb „fogyasztója”. Ugyanakkor a gyógyszerek kismolekulás anyagai körében is előfordulnak amorf szilárd fázisok.

Az amorf szilárd anyagokban csak rövidtávú rendezettség érvényesül, a kristályok hosszútávú translációs szimmetriája nem. Az amorf anyag termodinamikai értelemben mindig instabil, adott vegyület esetén mindig nagyobb energiájú, mint a kristályos forma (formák). Az amorf gyógyszerhatóanyagok oldhatósága, oldódási sebessége éppen emiatt



nagyobb, ezért jöhet szóba készítményekben történő alkalmazásuk. Esetükben ugyanakkor természetesen nagyobb a kockázata annak, hogy hosszabb idő alatt a szilárd anyag szerkezete átalakul, akár lassú kristályosodás, akár kémiai átalakulás következtében.

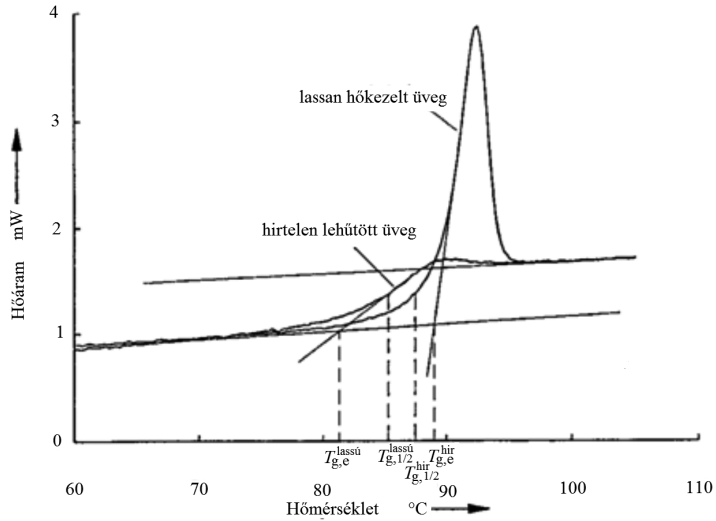
Az amorf anyagok melegítésekor az üveges állapot megszűnése másodrendű átalakulás: nincs határozott olvadáspont és olvadáshő (valamint ugrásszerű móltérfogat- és entrópiaváltozás sem), hanem a termodinamikai állapotfüggvények második deriváltjai, a fajhő és a hőtágulási együttható változnak meg. A fajhő megváltozása a DSC- görbén egy lépcső formájában jelenik meg (2.25. ábra).



2.25. ábra. Üvegesedési átmenet és jellemzői a DSC-görbén (endoterm irány: kitérés felfelé)<sup>2</sup>

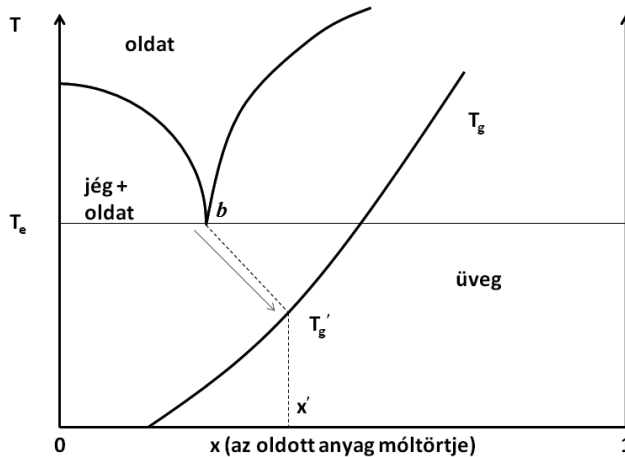
Az üvegesedési átmenet hőmérséklete függ a minta előéletétől, elsősorban attól, hogy milyen gyors hűtéssel állították elő az amorf szerkezetet, amelyet a mérés során melegítünk. Ha az átmenet a nagyobb hőmérsékletek irányába tolódik el, a hőkapacitás változásán (a DSC-lépcsőn felül) egy endoterm relaxációs csúcs is jelentkezik (2.26. ábra).

A DSC igen fontos többek között a liofilezéssel (fagyasztva szárítással) előállított termékek vizsgálatában. A 2.27. ábrán vízből és oldott anyagból álló rendszer fázisdiagramjának vázlatát láthatjuk. A példában szereplő rendszer eutektikus típusú, a telített oldat (ld. a felső, V-alakban található görbéket) a tiszta kristályos komponensekkel tarthat egyensúlyt. Ha vízben gazdag oldatot hűtünk, akkor jég kikristályosodása mellett eljuthatunk az eutektikus hőmérsékletig és összetételig (a diagram *b* pontja). Itt a folyadék megszilárdulhat a két komponens kristályainak keverékeként,



2.26. ábra. Relaxációs átmenet (endoterm irány: kitérés felfelé)<sup>2</sup>

ahogy azt a fázisdiagramok tárgyalásakor érintettük. Ha azonban ez nem következik be, az oldat – miközben a szárítás hatására töményebbé válik az oldott komponensre nézve – végül elérheti az üveges átmenet görbéjét, és megdermedhet (ld. a szaggatott vonalat).<sup>22</sup>

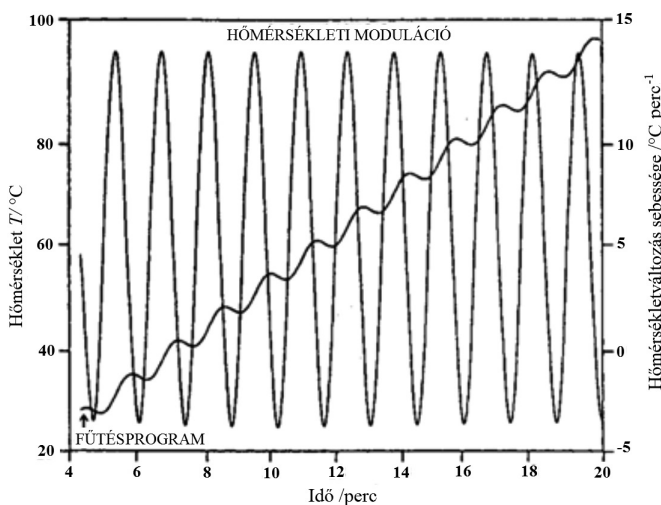


2.27. ábra. Liofilezés: kétkomponensű rendszer üvegesedési átmenettel<sup>22</sup>

A  $T_g$ - $x$  görbe ismerete azért fontos, mert ha a tárolt termék hőmérséklete eléri az adott összetételhez tartozó üvegesedési hőmérsékletet, az anyag összeomlik: fajlagos felülete lecsökken, sőt bomlási folyamatok indulhatnak meg benne.

A modulált hőmérsékletű DSC alapjait Reading és munkatársai dolgozták ki a 90-es évek elején azzal a céllal,<sup>23</sup> hogy az átalakulások során fellépő reverzibilis és irreverzibilis folyamatokat meg lehessen különböztetni. E mérés technika lényege, hogy a hőmérsékletprogram egy hagyományos, állandó fűtési vagy hűtési sebességű komponens és egy periodikusan változó (általában szinuszos) komponens összege (2.28. ábra):

$$T = T_0 + \beta \cdot t + B \cdot \sin(\omega t) \quad (2.8)$$



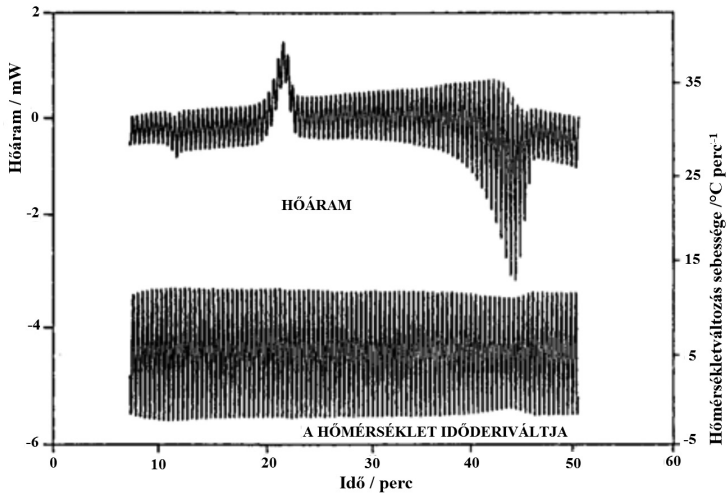
2.28. ábra. A hőmérséklet és a fűtési sebesség változása MTDSC-mérésben

A 2.29. ábrán – tankönyvi példaként – poli(etiléntereftalát), PET modulált DSC-görbéjét, illetve a hevítési sebesség időbeli alakulását mutatjuk be. A kapott DSC-görbén is látszik a periodikus moduláció hatása.

Az MTDSC-görbék értékelése abból indul ki, hogy az idő függvényében mért hőáram is két komponensből áll:

$$dQ/dt = C_p \cdot dT/dt + f(t, T), \quad (2.9)$$

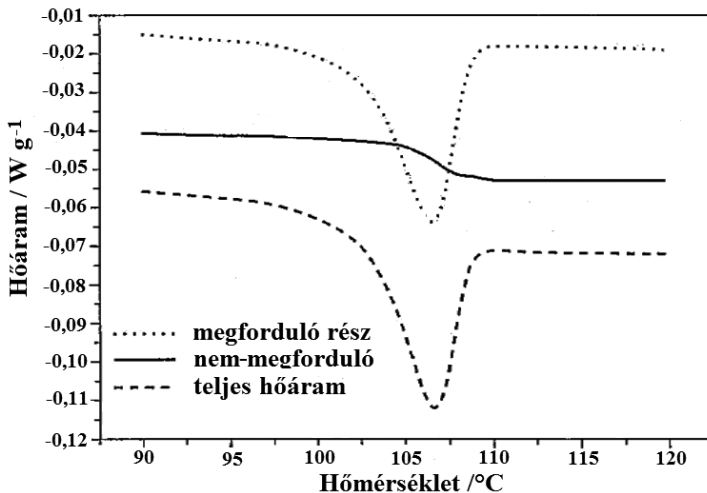
ahol az első tag a hőkapacitással függ össze (mint pl. az üvegesedési átmenet), a második pedig a kinetikus komponens (pl. gátolt szerkezeti átalakulás vagy kémiai reakció eredménye). A mért hőáramjel dekonvolúciójával (felbontásával) pedig egy megforduló és egy nem-megforduló görbét kapunk, melyek a hőkapacitással összefüggő, illetve a kinetikus folyamatokat írják le.



2.29. ábra. PET modulált DSC-görbéje

Az említett két összetevő általában nem felel meg a termodinamikai értelemben vett reverzibilis és irreverzibilis folyamatoknak, mert függenek a kísérleti paramétereiktől (a hőmérséklet-moduláció frekvenciájától és amplitudójától) is – angol elnevezésük is „*reversing signal*” és „*nonreversing signal*”.

A modulált DSC alkalmazása akkor hasznos, ha egymással átlapoló folyamatokat kell szétválasztanunk; ezt a *Saquinavir* példáján mutatjuk be (2.30. ábra).



2.30. ábra. A *Saquinavir* MTDSC-görbéi<sup>24</sup>

Az ábrán a teljes hőáram, valamint a megforduló és a nem-megforduló komponens szerepel. A felbontással sikerült az amorf anyag üvegesedési átmenetét (hőkapacitás tag) elválasztani a relaxációs komponensstől (kinetikus tag).<sup>24</sup>

Bár ahogy az előzőekben körvonalaztuk, a modulált DSC-méréstechnika a gyógyszerkutatásban is használható, a szakterületen egyelőre nem terjedt el. Ennek egyik oka a mérések nagy időigénye, és az, hogy a hőmérsékletprogram paramétereinek megállapításához alapos előkísérletekre van szükség.

## **2.5. Szimultán és kapcsolt módszerek. Fejlődőgáz-elemzés (EGA)**

### **2.5.1. Szimultán TA-módszerek megvalósítása, előnyei**

Szimultán mérésről akkor beszélünk, ha egyazon mintán több sajátság változását követjük egyidejűleg. Így egyrészt többféle információhoz jutunk egy és ugyanazon mintaállapotról és annak változásairól, másfelől megbízhatóbban és meggyőzőbb erővel tudjuk összevetni és magyarázni a mért görbéket, mintha azokat külön-külön berendezésben kaptuk volna. Utóbbiak gyakran szignifikánsnak látszó hőmérsékleti eltéréseket is mutathattak/mutathatnak a kemencés mérőterek eltérő műszaki kialakítása, a mintatartó és az érzékelő elhelyezésére szolgáló megoldások, és az egyes berendezésekhez ajánlott optimális mérési paraméterek (öblítő gázáramok, mintamennyiségek, fűtési sebességek) függvényében. (Minderről a kísérleti körülményeknek a termoanalitikai mérési eredményekre gyakorolt hatásával kapcsolatban korábban már szoltunk.)

Az első, sorozatban gyártott szimultán termoanalitikai műszert a BME Általános és Analitikai Kémiai Tanszékén fejlesztették ki (Erdey László, Paulik Ferenc, Paulik Jenő), s ezt a MOM (Magyar Optikai Művek) segítségével állították elő és forgalmazták *Derivatograph* néven.<sup>3</sup> A készülék először tette lehetővé TG-, DTG- és DTA-görbe egyidejű felvételét, amelyek körét a későbbi fejlesztések során termodilatometriás, termogáz-titrimetriás, vízgőzmérő és egyéb speciális kiegészítő egységek segítségével tovább is bővítettek.<sup>25</sup> Ma már a műszergyártók többsége szintén forgalmaz termikus műszerválasztékában ilyen szimultán (elsősorban TG/DTA-nak, újabban TG/DSC-nek nevezett) mérőberendezéseket.

Gyógyszerhatóanyagok, különböző szerves intermedierminták DSC-mérése során az olvadáspont tájékán gyakorta tömegváltozással is járó folyamatok is megindulnak; pl. az olvadáspont előtt szublimáció, az olvadással együtt, vagy azt követően, párolgás, ill. gázképződéssel járó kémiai bomlás, degradáció. A lezárt tégelyben végzett DSC-mérések során a szublimáció általában csak kismértékű (visszaszorul), ill. a kissé hidegebb tégelytetőn bekövetkező kondenzáció miatt ritkán ad jelet elkülönülten, míg az olvadáspontot követően megjelenő kiszélesedő endoterm hőeffektusok párolgásra, esetleg bomlásra utalhatnak. Ezeket a mintákat a szimultán TG/DTA-, ill. TG/DSC-berendezésekben mérve az említett tömegváltozással járó folyamatokon túl arról is megbizonyosodhatunk, hogy a végső olvadáspontot megelőzően szintén sok esetben váratlanul jelentkező hőeffektusokhoz tartozik-e számottevő tömegváltozás, avagy azokat csupán a kondenzált fázisokban bekövetkező módosulatváltozás, vagy esetleg termotróp folyadékkristályos viselkedés okozza-e.

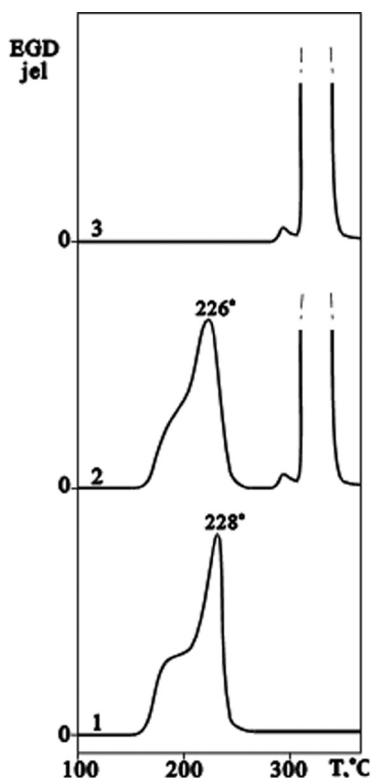
Nagyon hasznosak a gyógyszeripari kutatásokban az ún. fűthető tárgyasztal („*hot-stage*”) jelleggel megvalósított, kombinált termoanalitikai vizsgálatok, így pl. polarizációs, IR-, ill. Raman-spektroszkópiás mikroszkópia, ill. magas hőmérsékletű por-röntgendiffrakció, HT-XRD, melyek során elektromágneses sugárzás (polarizált fény, infravörös, ill. Raman-spektroszkópiás sugárforrás fénye, vagy éppenséggel röntgensugárzás) vetül a mintára, azzal kölcsönhatásba lépve elforgatódik, elnyelődik, szóródik vagy akár elhajlik, és azt a kemencéből kivezetve a minta kristályosságára, ill. spektrális tulajdonságaira, szerencsés esetben összetételére kaphatunk érdemi felvilágosítást. Az említett analitikai módszerekhez a nyitott mintatartójú DSC-berendezés is jól kapcsolható. Egy-egy ilyen új, szimultán méréstechnikai kombinációnak tekinthető a XRD-DSC<sup>26</sup> vagy a FTIR-mikroszkópia–DSC<sup>27</sup> ötletes megvalósítása is.

## 2.5.2. Fejlődőgáz-elemzés (EGA) speciális detektorokkal

Fejlődőgáz-analízisről (Evolved Gas Analysis, EGA) akkor beszélünk, ha a programozott hőmérsékletű fűtés során a mintából képződő gázokat, gőzöket – általában öblítőgáz segítségével – kivezetjük (ui. az *in situ* szimultán mérésüket a kemencén belül általában rendkívül nehéz mérnöki feladat lenne megoldani), de aztán az összetételüket on-line módon (analógjel-képzés segítségével, ill. sűrű mintavételezéssel) közvetlenül és gyakorlatilag folyamatosan, avagy off-line módon szakaszosan mintázva, utólagosan mérjük-elemezzük. Például egyfajta ilyen ötletes megoldás

volt a már említett Derivatograph és egy-egy automata titrátor összeépítése kapcsolt termogáz-titrimetriás berendezéssé.<sup>27</sup>

Korábban a termoanalitikai kemencéhez – az anyagmintákból fejlődő és megfelelő módon kivezetett gázok követése, detektálása és mérése végett – a gázkromatográfiában hagyományosan alkalmazott ionizációs detektorokat, illetve egyedi (pl. vízre, szén-dioxidra specifikus) érzékelőket építettek be. Így pl. a szerves gőzöket univerzálisan és széles koncentrációhatárok között érzékelő hidrogénláng-ionizációs detektort (FID) is, mellyel igen sok értékes vizsgálatot tudtak elvégezni kollégáink. A 2.31. ábra görbéit egy olyan készülék segítségével vették föl, melyben a mintateret nitrogén öblíti, és ez a vivőgáz viszi be a felszabaduló komponenseket a FID-detektorba.<sup>28</sup>



2.31. ábra. E-vitamin-acetát (1), a vitamin és  $\beta$ -ciklodextrin fizikai keverékének (2) és komplexének (3) FID-EGD-görbéi 8 °C/min hevítési sebességgel<sup>28</sup>

A ciklodextrin zárványvegyületeket többek közt érzékeny anyagok (gyógyszerhatóanyagok, aromák) illékonyságának csökkentésére, tárolás alatti oxidációjának kiküszöbölésére használják. Itt a vizsgálat annak

eldöntésére irányult, hogy a preparátum a  $\beta$ -ciklodextrin és az E-vitamin-acetát zárványvegyületének tekinthető-e, avagy még szabad állapotban is tartalmazza-e a vitamint.

A mechanikai keverék EGA-görbén a vitamin bomlásának megfelelő csúcs megegyezett a tiszta vitaminéval (2.31. ábra). A preparátum felvételén (a felső görbén) a szabad vitamin bomlására jellemző csúcs nem jelentkezett, tehát a komplexképzés sikeres volt, az érzékeny vendégmolekula csak magasabb hőmérsékleten, a ciklodextrinnel együtt bomlott el. Ha zárványvegyület és szabad hatóanyag is van a mintában, az utóbbi mennyiségét a csúcs területe alapján határozhatjuk meg.

### **2.5.3. Kapcsolt EGA-módszerek: TG-EGA-MS, TG-EGA-FTIR**

Általánosan elmondható, hogy jól megválasztott mérés technikák összekapcsolásával részletesebb és sokkal megbízhatóbb eredményekre juthatunk, mint az egyes módszerekkel külön-külön végzett vizsgálatok révén. Tekintve, hogy a leggyakrabban alkalmazott termoanalitikai módszerek (TG, ill. DSC/DTA) a szilárd vagy folyékony mintáknak csupán a tömeg-, illetve az entalpiaváltozását követik, a fázisátalakulásokban és kémiai reakciókban felszabaduló gázok azonosítására, elemzésére alkalmas spektroszkópiás technikák hozzájuk kapcsolása igen hasznos információkat szolgáltat a minták termikus viselkedéséről, stabilitásáról, ill. felgyorsított degradációjáról, termikus bomlásáról.

Leggyakrabban termomérlegekhez, illetve szimultán TG-DTA(DSC) berendezésekhez kapcsolnak a felszabaduló illékony anyagok elemzésére alkalmas műszereket, így a tömegvesztéssel járó lépésekben egyértelműen megismerhetővé és hozzárendelhetővé válhatnak az adott hőmérsékleti tartományban távozó légnemű anyagok, bomlástermékek. Ma a legelterjedtebbek a termogravimetriás-tömegspektrometriás (TG-MS) és a termogravimetriás – Fourier-transzformációs infravörös spektrometriás (TG-FTIR) kapcsolt rendszerek. Továbbá kifejlesztettek és alkalmaznak gázkromatográfiás (GC) berendezésekkel történő összekapcsolásokat is, főleg olyan esetekre, amikor az elemzéshez a gázkomponensek szétválasztása is szükséges. Azonban a gázkromatográfiás elemzési idők általában hosszúak a termogravimetriában szokásos fűtési sebességekhez képest (tehát két kromatogram felvétele között olyan sok idő telhet el, hogy közben jelentősen megváltozhat a minta hőmérséklete, s vele a fejlődő gázok minősége, összetétele). Így a csatolt gázkromatográfia kevésbé



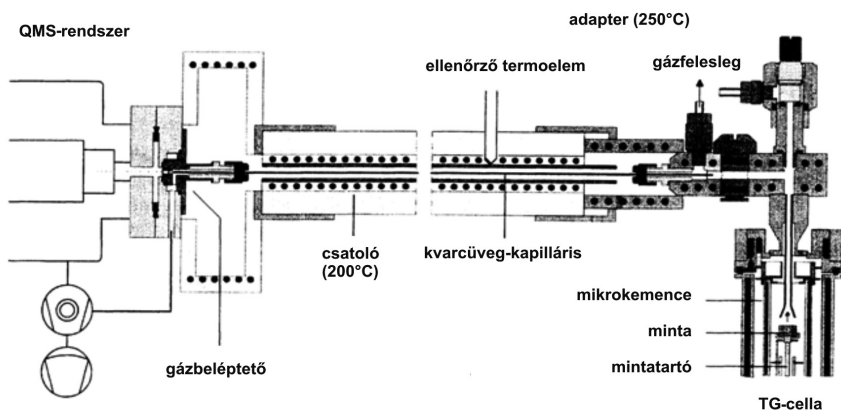
elterjedten használatos, legalább is valós idejű elemzések során, mint a kapcsolt FTIR- és MS-technikák. A rokon módszerek számítógépes gázkromatográfia (Py-GC-MS) fő alkalmazási területe pedig a természetes és mesterséges polimer rendszerek vizsgálata, ahol igen sokféle, kisebb-nagyobb molekulájú illékony bomlástermék megjelenése várható, amelyek a megfelelő elválasztás után ujjlenyomatszerű kromatogramot adva az MS-detektorok segítségével jól elemezhetők. A pirolízishez azonban kezdetben igen gyorsan fűtik fel a mintát, ennek következtében más (vagy részben más) folyamatok játszódhatnak vagy játszódhatnak le, mint a termoanalitikai berendezésekben. Az alábbiakban a TG-MS és TG-FTIR technikákat mutatjuk be röviden, a következő fejezet pedig ezek néhány tipikus alkalmazását tárgyalja.

A tömegspektrometria jelentős előnye, hogy képes (a spektrométerre jellemző felső tömeghatárig) az érkező összes gázhalmazállapotú komponenst rendszerint nagy érzékenységgel detektálni. A spektrumsorozatokban megjelenő molekulák, ill. a fragmentálódási folyamatokban keletkező ionok alapján kísérhető meg a gázok/gőzök azonosítása, a jellegzetes egyedi fragmentumok többcsatornás figyelésével pedig az egyes komponensek fejlődésének nyomon követése, esetleg mennyiségi mérése.

A termoanalitikai berendezés és a tömegspektrometriás (leggyakrabban elektronütközéses, EI) ionforrás jelentősen eltérő nyomású tereinek a nyomáskülönbséget fokozatosan áthidaló közvetlen összekötése szükséges. TA-MS kapcsolt rendszerekben erre a célra napjainkban kapillárisok alkalmazása vált a leggyakoribb csatolási móddá. Leginkább a kapilláris gázkromatográfiában jól ismert keskeny nyílású („*narrow bore*”, 0,1 mm körüli belső átmérőjű) flexibilis kvarcüveg (*fused silica*) kapillárisok kerülnek alkalmazásra. A szilanolos OH-csoportok okozta, poláris komponensekre (pl.  $H_2O$ ,  $HCl$ ) gyakorolt visszatartó hatást pedig a kvarcüveg-kapilláris belső felületének megfelelő dezaktiválásával (leggyakrabban gyártói belső trimetilszililezéssel) mérséklük, ill. küszöbölk ki. A gőzök kondenzációjának elkerülésére a kapilláris megfelelő fűtéséről, termosztálásáról szintén gondoskodni szoktak (2.32. ábra).

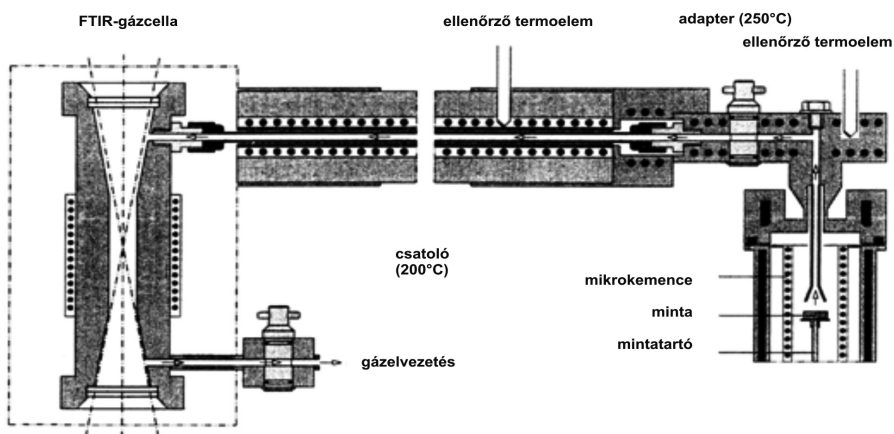
A TG-MS rendszerekben többnyire kvadrupól tömegspektrométert (QMS) alkalmaznak, ennek fő oka a QMS alacsony ára. A QMS egyik korlátja az, hogy kifelébontású, azaz az egyszerre jelentkező különböző molekulák közel azonos tömegszámú fragmentumai közvetlenül nem különülnek el, valamint, hogy a mérhető tömegtartomány viszonylag szűk, rendszerint 1-től 200-400 amu-ig terjed. Ez utóbbi általában elegendő ugyan szerves gázokra és nem túl nagy molekulatömegű szerves

gőzökre, ill. a belőlük képződő fragmensionokra, de a polimereket vizsgáló Py-GC-MS alkalmazásokhoz szélesebb tömegtartomány válhat szükségessé. Az MS előnye az FTIR-es megoldásokhoz viszonyítva, hogy képes detektálni az IR-elnyeléssel nem rendelkező kétatomos elemi gázok molekuláit ( $O_2$ ,  $H_2$ ,  $N_2$  stt.) is.



2.32. ábra. TG-MS–fejlődőgázelemző berendezés egy lehetséges kapcsolási megoldása [STA 409 (Netzsch) with QMS (ThermoStar, Balzers)]<sup>25</sup>

Az FTIR-spektroszkópiás EGA-megoldások előnye viszont a MS-hez képest az, hogy a mérések nem kívánnak vákuumot, és így olyan különleges összekapcsoló elemet sem, amely a nyomás lecsökkentéséhez kellene. Egy egyszerű fűtött cső is elegendő ahhoz, hogy az FTIR-spektroszkópiás gázcellát összekössék a termikus alapkészülékkel (2.33. ábra).



2.33. ábra. TG-FTIR–fejlődőgázelemző berendezés egy lehetséges kapcsolási megoldása [TG 209 (Netzsch) with transfer line for FTIR (Vector 22, Bruker)]<sup>29</sup>

Mind a többatomos szerves gázvegyületeket, mind a sokatomos szerves gőzöket jellegzetes rezgési spektrumaik alapján azonosíthatjuk, ill. karakterisztikus rezgési sávjaik alapján követhetjük nyomon azokat, szerencsés esetben több légnemű termék egyidejű megjelenése során is. Ebben nehézségek, spektrális átfedések formájában, azonos funkciós csoportokat tartalmazó homológ gőzök keverékének megjelenése esetén várhatóak. Az MS-, ill. FTIR-kapcsolások, ha mindkét kapcsolt módszerrel elvégezzük egyazon anyag vizsgálatát, sok esetben kompenzálni képesek egymás hátrányait, mivel a spektrális átfedések ritkán jelentkeznek egyszerre mindkét módszernél. Erre alapozva készülnek és jól használhatók a kombinált, sorba, ill. párhuzamosan kapcsolt TG-FTIR-MS mérőrendszerek is.

Mind az FTIR- és MS-megoldás a kimutatási határok tekintetében rendkívül érzékeny lehet, bár az egymáshoz viszonyított érzékenységük nagymértékben változhat a termoanalitikai kemencéből érkező különböző termékek összetétele és az öblítő gáz természete szerint. Mindkét módszer alkalmassá tehető mennyiségi meghatározásra is, de a legtöbb TA-EGA mérés mégis minőségi vagy félmennyiségi jellegű. Különösen sok munka szükséges ugyanis a kísérleti eljárások és kalibrációs technikák fejlesztésében ahhoz, hogy alacsony koncentrációban megjelenő termékek pontos mennyiségi meghatározását is el lehessen végezni.

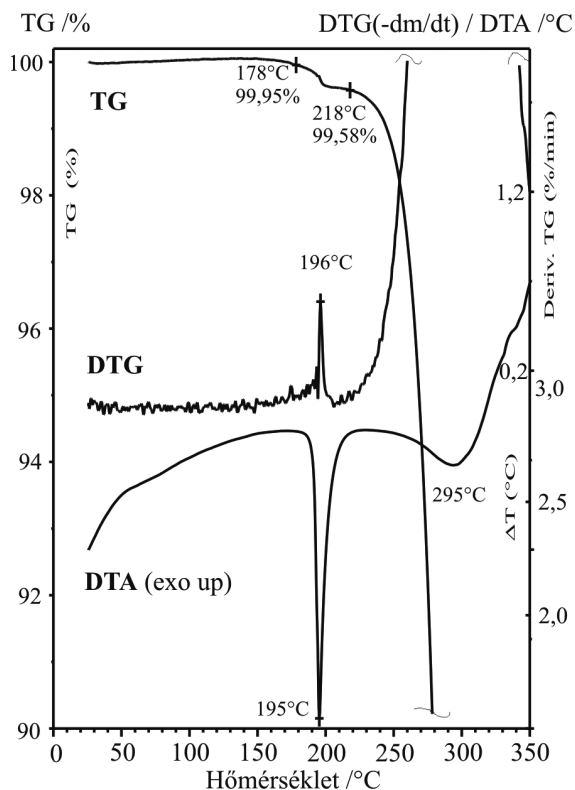
### **2.5.3.1. Kristályhidrátok, -szolvátok és oldószerzárványok jellemzése**

A gyógyszeripari szerves hatóanyagok és segédanyagok körében is számos esetben találkozhatunk olyanokkal, amelyek kristályrácsába kisebb-nagyobb stabilitással víz- vagy egyéb oldószer-molekulák is beépülnek. A képletegységre jutó beépülő vízmolekulák sztöchiometriai számáról általában termogravimetriás mérés segítségével szoktunk tájékozódni. Ezt a tájékozódó értékelést megnehezítheti a minta lazán kötődő – gyakran a szemcsék fajlagos felületétől is, de elsősorban a környezeti páratartalom és a minta egyensúlyi gőznyomása közötti viszonytól függő mértékű – aktuális nedvességtartalom, továbbá a mintába kémiaiilag beépülő, de ennek ellenére még viszonylag alacsony hőmérsékleten kiszabaduló szerkezeti víztartalom is. A víz-, ill. oldószer-molekulák felvételének, ill. leadásának részletes és alapos vizsgálatára általában dinamikus gőzszorpciós, illetve -deszorpciós (DVS) méréseket végeznek kvarckristály ultramikromérlegek segítségével szabályozható hőmérsékletű és páratartalmú kamrákban.<sup>30</sup>

Az előállítások, kristályosítások és leválasztások során előállhatnak olyan esetek is, hogy az oldószer apróbb zárványok formájában zárul a szemcsékbe, ill. a szemcsék közé, továbbá oldószerelegyből kristályosított, ill. leválasztott kísérleti minták esetén nem lehetünk teljesen biztosak a beépülő kristályoldószer minőségében, ill. összetételében. Ilyenkor tájékozódásul hasznos lehet TG-MS, ill. TG-FTIR kapcsolt fejlődőgáz-elemzési mérések segítségül hívása.

Első példánkban a 195-196 °C-on észlelt olvadáspontján a szerves anyagminta – a szimultán TG/DTA-felvétele alapján – igen kismértékű (kb. 0,33-0,37%-nyi), de – ismételt mérések szerint – szignifikáns súlycsökkenést mutat. A derivatív termogravimetriás (DTG-) görbe is megerősíti ezt, viszont az olvadási endoterm csúcsnál nem észlelhető elkülönülő hőeffektus (2.34. ábra).

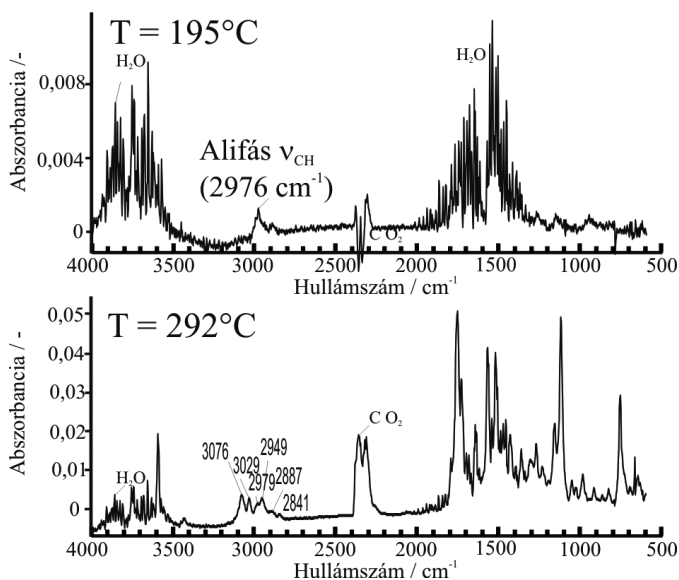
A segítségül hívott TG-FTIR-spektroszkópiás fejlődőgáz-elemző berendezésünkkel sikerült a minta olvadása során,  $T = 195$  °C körül,



2.34. ábra. Oldószerzárványt tartalmazó szerves anyagminta szimultán TG/DTA-mérése során nyert TG-, DTG- és DTA-görbéi (130 ml/perc levegőáram, 10 °/perc felfűtési sebesség, kezdeti bemérés 6,93 mg)

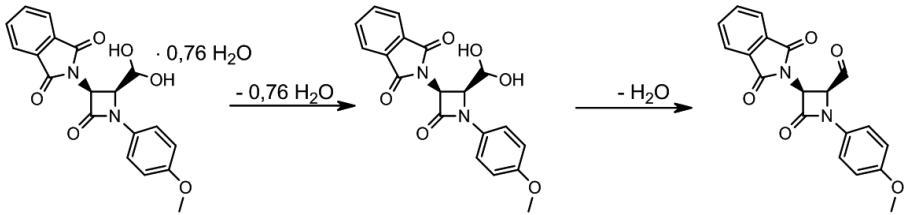
vélhetően zárványformájukból kiszabaduló szerves gőzöket észlelni, melyek kötésnyújtási CH-rezgései aztán a további melegítés során már nem jelentkeztek újra. A 2.35. ábra felső spektrumában a vízgőz rezgés-rotációs sávrendszerei között,  $2976\text{ cm}^{-1}$  körül látható, hogy megjelentek valamely átmenetileg előtörő szerves oldószer gőzének alifás CH kötésnyújtási rezgéseinek abszorpciós csúcsai.

A 2.35. ábra alsó FTIR-gőzspektruma alapján a magasabb hőmérsékleten ( $T = 292\text{ °C}$ -on) lejátszódó folyamatokra is rámutathatunk. Ekkor már csak az előzőtől jelentősen eltérő spektrummal bíró, megolvadt minta gőzének fejlődése látható a növekvő hőmérséklettel egyre növekvő koncentrációban, bár némi szén-dioxid-fejlődés is jelentkezik; ez utóbbi a gőzök meginduló részleges légtéri oxidációjára utal.<sup>31</sup>



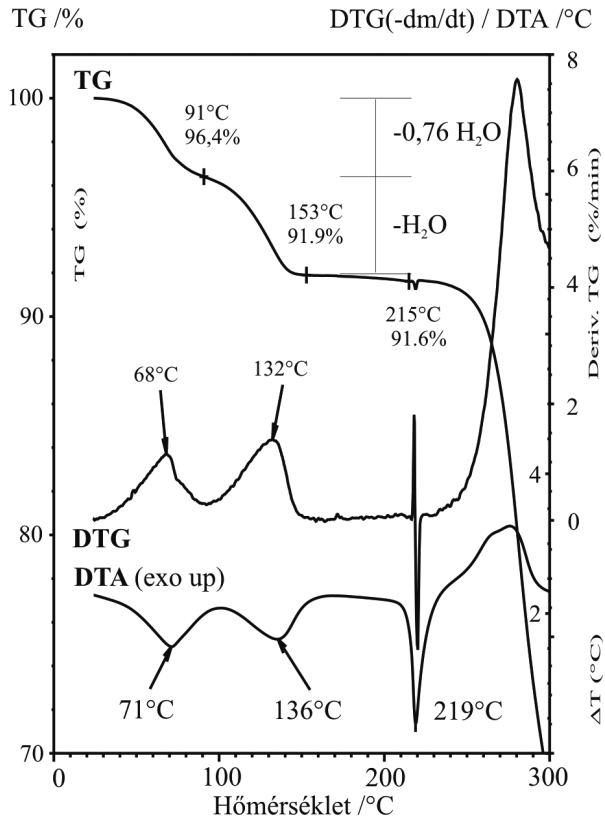
2.35. ábra. Az oldószerzárványt tartalmazó szerves anyagminta kapcsolt TG-FTIR-spektroszkópiás fejlődőgáz-mérése során  $T = 195\text{ °C}$ -on (felül) és  $T = 292\text{ °C}$ -on (alul) kapott gőzspektrumok levegőáramban

Következő példánkban egy  $\beta$ -laktám-karbaldehyd<sup>32</sup> előállításánál során sósavas vizes dimetil-formamidos oldatból nyert szilárd mintáról sikerült, többek között szimultán TG/DTA-MS módszer segítségével, igazolni, hogy az a várt karbaldehyd geminális dioljának kristályvizes módosulata (2.1. séma). A TG-görbén két, viszonylag jól elkülönülő lépésben 3,6, ill. 4,5%-nyi tömegvesztés volt tapasztalható, amelyek a DTG-görbe szerint 68 és 132  $\text{°C}$ -on voltak maximális sebességűek. A légnemű termékek távozása a DTA-görbén is endoterm hőeffektusokat mutatott, mégpedig a



2.1.séma. A  $\beta$ -laktám-karbaldehid geminális dioljának vízvesztési lépései

vízmentes vegyület 219 °C körül észlelt (s az irodalmival viszonylag jól egyező) olvadáspontja alatt (2.36. ábra).

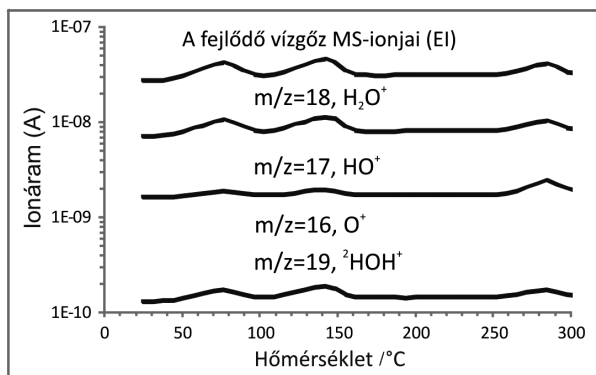


2.36. ábra. A  $\beta$ -laktám-karbaldehid geminális diol-hidrát mintájának szimultán TG/DTA-mérése során nyert TG-, DTG- és DTA-görbék (130 ml/perc levegőáram, 10 °/perc felfűtési sebesség, kezdeti bemérés 10,05 mg)

A TG- és DTG-görbén 215 °C-on jelentkező gyors tranziens hatást az okozza, hogy a szilárd szemcsékből keletkező olvadékcseppek a felületi

szabadenergia-többletüket csökkentve hirtelen egyesülnek, s ennek mechanikai hatását érzékeli a mérleg.

A kapcsolt kvadrupól tömegspektrométeres mérőrendszer segítségével megállapítható volt az is, hogy az első két tömegvesztési lépésben egyaránt vízgőz távozott. A távozó vízgőz elektronionizációs tömegspektrumában megjelenő különböző tömeg/töltés arányú pozitív ionok ionáramának nyomon követésével, utóbbiakat logaritmikusan ábrázolva a mintahőmérséklet függvényében, párhuzamos lefutású vízgőz-fejlődésmenet görbéket kaptunk, melyeket a 2.37. ábrán mutatunk be.

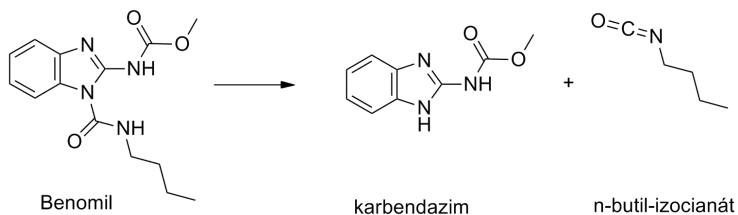


2.37. ábra. A  $\beta$ -laktám-karbaldehid geminális diol-hidrát mintájának kapcsolt TG/DTA-MS mérése során többszörös ionkövetési módban, többcsatornásan nyert vízgőzfejlődésmenet-görbék, a vízgőz jellegzetes MS-ionjaira mérhető ionáramok (logaritmus) alapján (130 ml/perc levegőáram, 10 °/perc felfűtési sebesség, bemérés 10,05 mg;a harmadik vízgőzfejlődési lépés már magának a vízmentes aldehidnek az oxidatív bomlását kíséri)

Mivel más oldószerre utaló fragmensionokat nem észleltünk, az első tömegcsökkenési lépést rácsközi kristályvíz, a másodikat pedig a geminális diolból eliminációval kilépő szerkezeti víz távozásának feleltethetjük meg. Így a különböző erősséggel és jelleggel kötött víztartalom elkülönülő hőmérséklet-tartományban történő távozására is egy újabb demonstratív példát láthattunk.

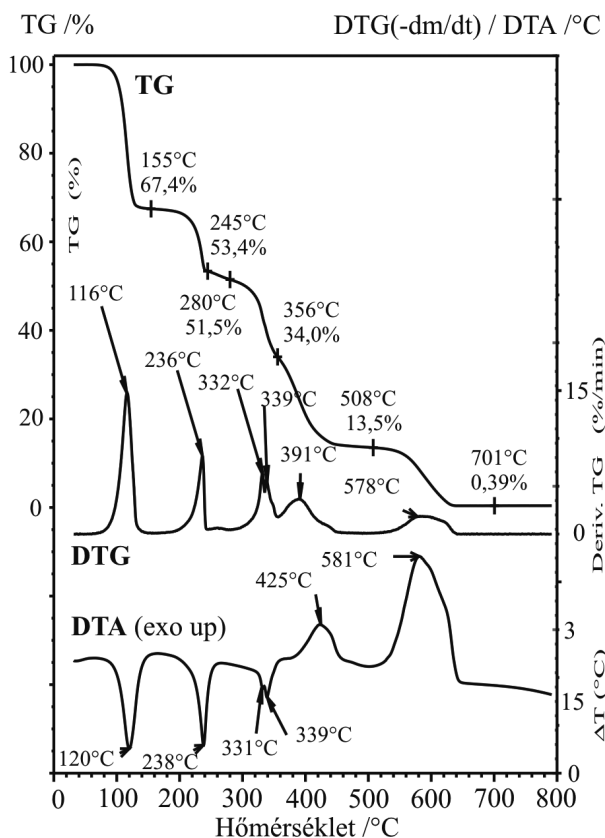
### 2.5.3.2. Bomlási folyamatok leírása

A szerves hatóanyagok esetén biztosan felmerül a fejlődőgáz-elemzés igénye, ha a vegyület viszonylag alacsony (100 °C alatti vagy ahhoz közeli) hőmérsékleten már bomlást, degradációt szenvedhet, és ekkor fontos meg tudni a kishőmérsékletű bomlás termékeit, beleértve a légneműeket is.



2.2. sÉma. A Benomil és elsődleges bomlástermékei

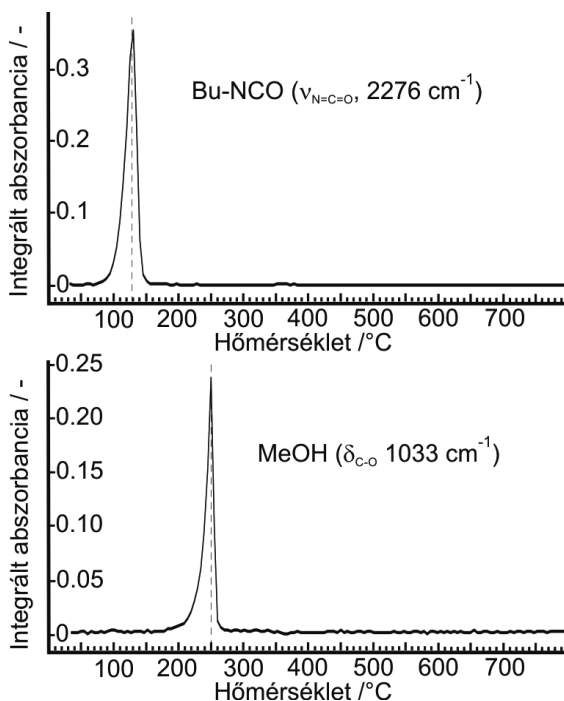
A *Benomil* (vagy más néven *Benlate*, ismert gombaölő szer, 2.2. sÉma) a világ számos országában azért került tiltólistára, mivel magasabb hőmérsékleteken (főleg trópusi területeken történt szakszerűtlen tárolás alatt) idő előtt bomlani kezdett, és belőle ártalmas légnemű termék szabadult fel.



2.38. ábra. Benomil minta szimultán TG/DTA-mérése során nyert TG-, DTG- és DTA-görbék (levegőáramban, 10 °C/perc)



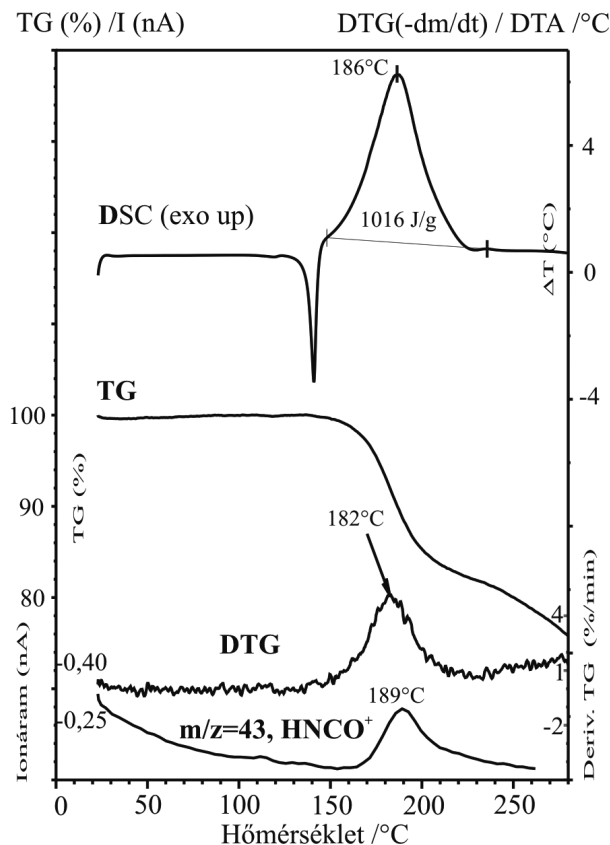
Szobahőmérsékleten még nem, de 10 °C/perces fűtés mellett 90-100 °C között, ill. még lassabb felfűtést alkalmazva (pl. 1 °C/perc esetén) pedig már kb. 65 °C körül megindul a bomlási folyamata.<sup>33</sup> Mind TG-FTIR, mind TG-MS–fejlődőgáz analízis szerint butil-izocianát-gőz fejlődik a mintából ebben az első bomlási lépésben (2.2. séma).<sup>34</sup> A közel sztöchiometrikus bomlási reakció szilárd terméke pedig karbendazim, amely a kiindulási anyag a Benomil előállításának utolsó lépésében. A folyamatnak ezt a leírását a csoportunkban végzett TG-FTIR és TG-MS vizsgálatok is megerősítették (2.38. ábra), sőt a további bomlási lépésekben keletkező főbb légnemű termékeket is sikerült azonosítanunk és nyomon követnünk,<sup>35</sup> amit a 2.39. ábrán az észlelt gőzök/gázok jellegzetes FTIR-spektroszkópiás elnyelési sávjai alapján megrajzolt fejlődésmenetek formájában mutatunk be.



2.39. ábra. Benomil minta levegőáramban végzett, kapcsolt TG-FTIR-spektroszkópiás fejlődőgáz-elemzési mérése során jól azonosítható termék-gázok fejlődésmenetei, jellegzetes elnyelési sávjaiknál integrálva az abszorbancaértékeiket

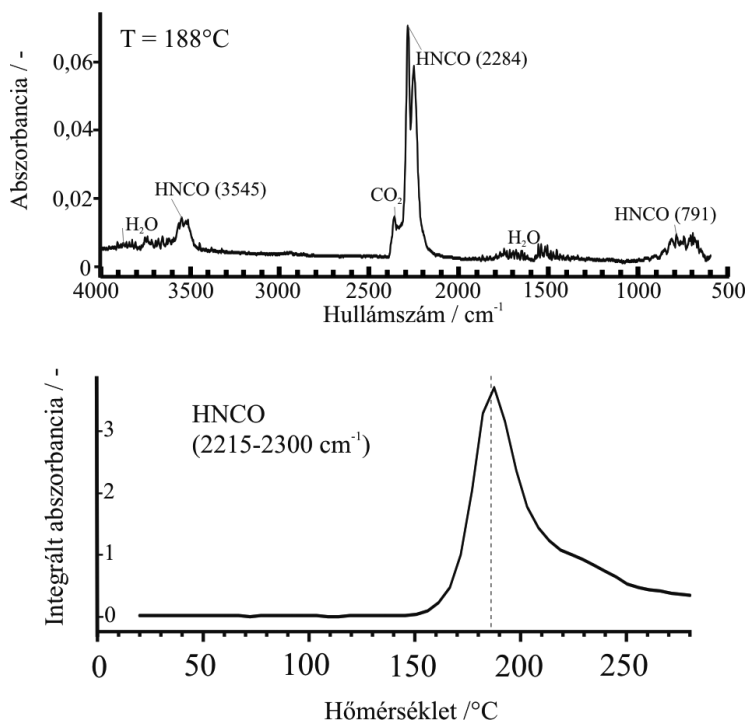
Abban az esetben is szükségessé válhat a fejlődő gázok azonosítása, ha az elvégzett DSC-vizsgálatok alapján felmerül annak gyanúja, hogy a minta a „nagyenergiájú” (esetleg robbanásveszélyes) anyagok közé

sorolandó. Leginkább levegőben exotermén bomló anyagok esetén fordulhat ez elő, amikor a DSC-n túl pl. kapcsolt TG/DTA-MS és vagy TG-FTIR vizsgálatok segíthetnek a válasz megadásában. A következő példánkban bemutatott szintetikus termék 145 °C körül bekövetkező olvadása után, exoterm folyamatban bomlik. A minta DSC- és TG/DTA-MS mérésének eredményei szerepelnek összerajzolva a 2.40. ábrán, ahol a legalsó görbe az egyetlen, tömegspektrometriásan észlelt ion ( $m/z = 43$ ) ionáramát mutatja a felfűtés során.



2.40. ábra. Exotermén bomló anyagminta DSC- (hermetikusan lezárt Al-tégelyben, 10 °/perc, bemérés 2,066 mg) és TG/DTA-MS (lezárt, majd a tetején tüvel kilyukasztott Al-kapszulában, levegőáramban) mérésének görbéi. A DTA-görbe megerősítette a DSC-vizsgálat eredményét, ezért külön nem mutatjuk. A bomlás hőfoktartományában csupán az  $m/z = 43$  tömeg/töltés arányú ion mutatott változást<sup>31</sup>

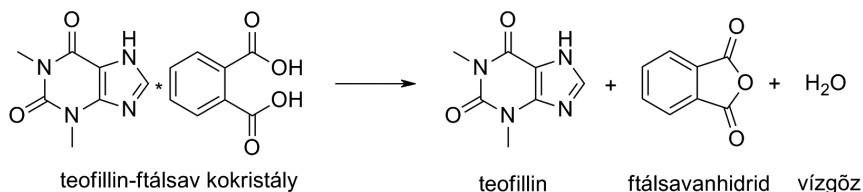
A párhuzamosan elvégzett TG-FTIR-spektroszkópiás kapcsolt fejlődőgáz-elemzés is, némi szén-dioxid-fejlődésen túl, egyetlen főkomponenst jelzett, mégpedig az izociánsav (HNCO) abszorpciós IR-sávjainak megjelenésével (2.41. ábra). Ez összhangban van a tömegspektrometriás eredménnyel, hiszen az izociánsav molekulaionjának az  $m/z$ -értéke éppen 43. Ennek az anyagnak a megjelenése azonban semmiképpen sem utal heves hőtermeléssel lejártszódó oxidációs folyamatra. Az olvadást követő exoterm csúcs valószínűleg a minta felületén, illetve a gázfázisban lejártszódó (részleges) oxidációhoz rendelhető.



2.41. ábra. Exotermen bomló minta levegőáramban végzett TG-FTIR mérésének eredményei: a bomlás első lépésében, a legnagyobb gázfejlődési sebességnél észlelt gőzspektrum, és az ott főkomponensként azonosított izociánsav fejlődésmenete. Az abszorbancia integrálása 2215 és 2300  $\text{cm}^{-1}$  között történt

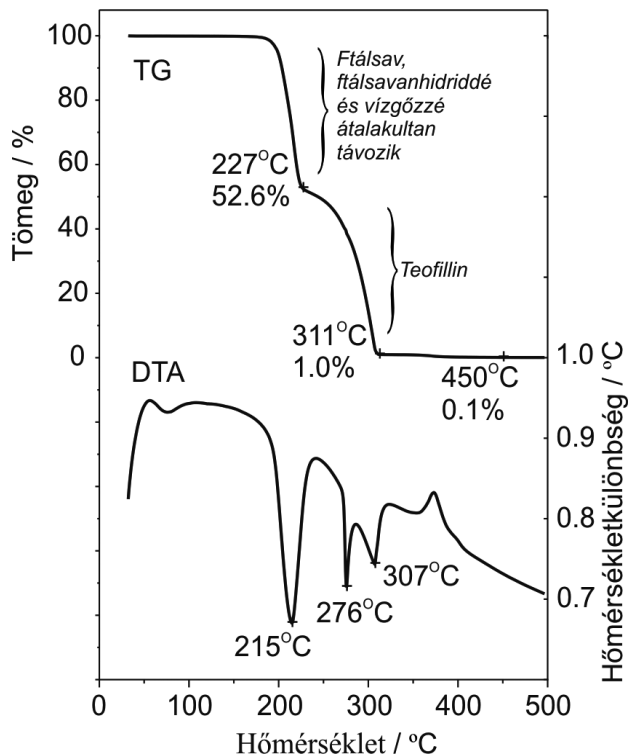
### 2.5.3.3. Szupramolekuláris vegyületek, kokristályok vizsgálata

A fejlődőgáz-elemzés, különösen a termogravimetriával kapcsolva (TG-EGA), a szilárd szupramolekuláris vegyületek jellemzésében is hasznos. A rácsvegyületeket (kokristályokat) alkotó molekulák sokszor hidrogénion-átadással sószerűen, avagy a semleges molekulák közötti másodlagos kötőerőkkel (van der Waals-erőkkel, de leggyakrabban hidrogénhidás kölcsönhatásokkal) kapcsolódnak egymáshoz. Különösen kézenfekvő a kapcsolt termoanalitikai módszerek alkalmazása olyankor, amikor a szupramolekuláris vegyület alkotóinak illékonyága jelentősen eltér egymástól (pl. ha az egyik könnyen párolgó folyadék vagy szublimáló szilárd anyag). Azokban a szerencsés esetekben, amikor a szupramolekuláris képződmény bomlása során az illékonyabb komponens távozása még a kevésbé illékony alkotó degradációja előtt teljes mértékben bekövetkezik, a TG-lépcsők alapján még az eredeti szupramolekuláris vegyületek kezdetben ismeretlen sztöchiometriájára is visszakövetkeztethetünk, amint azt az etanolammónium-teofillinát (1:1), a teofillin és az ikerionos etiléndiaminkarbamát kokristálya (1:1),<sup>36</sup> ill. az 1,4-diammóniumbután-bisz(teofillinát) (1:2) esetén<sup>37</sup> tehetjük.



2.3. séma. A teofillin-ftálsav kokristály és elsődleges bomlástermékei

Ha a szupramolekuláris vegyület hőstabilitása viszonylag nagy, előfordulhat, hogy a bomlási hőmérsékleti tartományában az illékonyabb komponens már saját forrponjtja közelében, avagy fölötté, ill. saját termikus stabilitásának határán szabadul ki. Ilyenkor nem mindig lehetünk bizonyosak abban, hogy a kérdéses komponenst eredeti kémiai formájában (tehát bomlás vagy más átalakulás nélkül), azaz a beépülésével egyező alakjában tudjuk azonosítani. A teofillin ftálsavas 1:1 mólarányú szilárd molekulavegyületének (2.3. séma) szimultán TG/DTA-EGA vizsgálata során a ftálsavmolekulának megfelelő tömegveszteség volt észlelhető a TG-görbén (2.42. ábra, felső görbe).

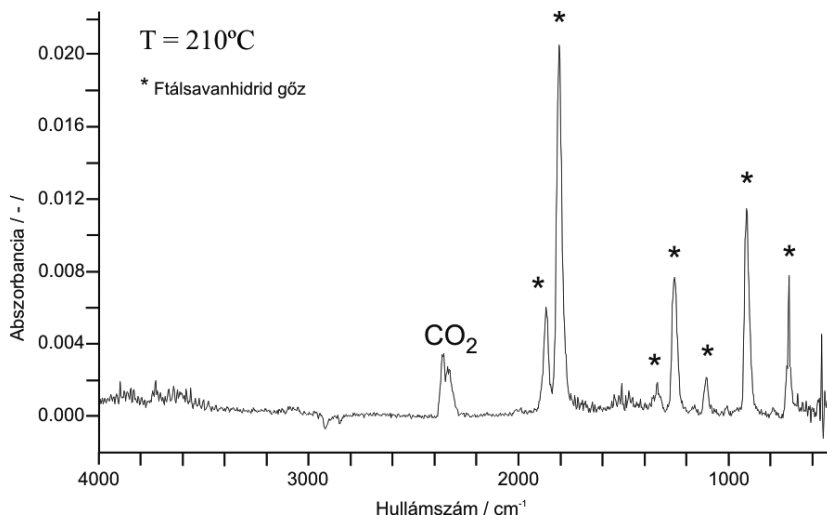


2.42. ábra. Teofillin-ftálsav 1:1 szupramolekuláris vegyületének szimultán TG/DTA-mérése során nyert TG- és DTA-görbék (130 ml/perc levegőáram, 10 °perc felfűtési sebesség, kezdeti bemenés 7,71 mg)

Viszont a TG-FTIR vizsgálatok gőzspektrumai a *NIST Chemistry Webbook* adatbázisával összevetve már a ftálsavanhidrid gőzeinek megjelenését mutatták (2.43. ábra), vagyis a távozó ftálsavat annak anhidriddé alakult formájában sikerült észlelni és azonosítani.<sup>38</sup>

A speciális detektorokkal végzett fejlődőgáz-elemzésről szóló alfejezetben már említettük a ciklodextrinek zárványkomplexeinek vizsgálatát, melyben a felszabaduló szerves gázok detektálása lángionizációs detektorral történt. E vizsgálatokat kapcsolt TG-EGA technika segítségével megismételve tovább növelhető a zárványkomplexeiről kapható információk mennyisége és minősége.<sup>40</sup>

Új rendszerek vizsgálatán túl tehát a kapcsolt termoanalitikai mérés technikáktól a korábbi eredmények kiegészítése és pontosítása is várható.



2.43. ábra. Teofillin-ftálsav 1:1 szupramolekuláris vegyületének szimultán TG-FTIR mérése során 210 °C-on (az első tömegvesztési lépcső legnagyobb távozási sebességénél) nyert FTIR-gőzspektrum; a csillaggal jelzett elnyelési sávok a ftálsavanhidrid gőzétől származnak<sup>39</sup> (130 ml/perc levegőáram, 10 °C/perc felfűtési sebesség, kezdeti bemérés 15,63 mg)

## 2.7. Irodalom

1. Brown M. E. *Introduction to Thermal Analysis: Techniques and Applications*, , Second Edition, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, **2001**.
2. Craig, D.Q.M.; Reading, M. (eds.): *Thermal Analysis of Pharmaceuticals*, CRC Press, Boca Raton, **2007**.
3. Paulik F.; Paulik J.; Erdey L., 145.369 sz. Magyar Szabadalom, **1955**; Paulik F.; Paulik J.; Erdey L. *Z. Anal. Chem.*, **1958**, *160*, 241.
4. Giron, D. *Thermochim. Acta* **1995**, *248*, 1.
5. Sztatisz J.; Gál S.; Fodor L.; Pungor E. *J. Thermal. Anal.* **1977**, *12*, 351.
6. Német Z., Doktori (PhD) értekezés, BME, Budapest, **2009**.
7. Német Z.; Hegedüs B.; Szántay Cs. Jr.; Sztatisz J.; Pokol G. *Thermochim. Acta* **2005**, *430*, 35.
8. Német Z.; Csonka Kis G.; Pokol G.; Demeter Á. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2009**, *49*, 338.
9. Demeter Á.; Német Z.; Varga Z. „Hatóanyagok mikronizálása” *in: Kristályosítástól a tablettázásig*, szerk.: Farkas B., Révész P., Universitas Szeged: Szeged, **2007**.

10. Madarász J.; Kozma D.; Pokol G.; Ács M.; Fogassy E. *J. Thermal Anal.* **1992**, *42*, 877.
11. Gönczi K.; Kudar V.; Jászay Zs.; Bombicz P.; Faigl F.; Madarász J. *Thermochim. Acta* **2014**, *580*, 46.
12. Thorey P.; Bombicz P.; Szilágyi I. M.; Molnár P.; Bánsághi G.; Székely E.; Simándi B.; Párkányi L.; Pokol G.; Madarász J. *Thermochim. Acta*, **2010**, *497*, 129.
13. Kozma D., ed.: *CRC Handbook of optical resolutions via diastereomeric salt formation*, CRC Press, Boca Raton, **2002**.
14. Wilen S. H.; Collet A.; Jacques J. *Tetrahedron*, **1977**, *33*, 2725.
15. Kozma D., Poszavác L., Ács M., Pokol G., Fogassy E. *J. Thermal Anal.* **1995**, *44*, 339
16. Kozma D.; Pokol G.; Ács M. *J. Chem. Soc. Perkin Trans.* **1992**, *2*, 435.
17. Illés R.; Kassai Cs.; Pokol Gy.; Madarász J.; Fogassy E.; Kozma D. *J. Thermal Anal. and Calorim.* **2000**, *61*, 745.
18. Kassai Cs.; Illés R.; Pokol Gy.; Sztatisz J.; Fogassy E.; Kozma D. *J. Thermal Anal. and Calorim.* **2000**, *62*, 647.
19. Illés R.; Kassai Cs.; Pokol Gy.; Fogassy E.; Kozma D. *J. Thermal Anal. and Calorim.* **2002**, *68*, 679.
20. Kozma D.; Böcskei Zs.; Kassai Cs.; Simon K.; Fogassy E. *J. Chem. Comm.* **1996**, 753.
21. Kozma D.; Fogassy E.; Kassai Cs. 216.617 Magyar Szabadalom.
22. Nail S. L.; Gatlin L.A. in *Pharmaceutical dosage forms: Parenteral medications*, Avis K.E.; Liebermann H.A.; Lachman L., eds., Marcel Dekker: New York, **1993**, pp 163-233.
23. Gill P.S.; Sauerbrunn S.R.; Reading M. *J. Thermal Anal.* **1993**, *40*, 931; Reading M.; Elliott D.; Hill V.L. *J. Thermal. Anal.* **1993**, *40*, 949; Reading M., *Trends Polym. Sci.* **1993**, *1*, 248.
24. Royall P.G.; Craig D.Q.M.; Doherty C. *Pharm. Res.* **1998**, *15*,1117.
25. Paulik Ferenc, *Special Trends in Thermal Analysis*, John Wiley & Sons, **1995**.
26. Arii T.; Kishi A.; Kobayashi Y. *Thermochim. Acta* **1999**, *325*, 151.
27. Lin, S. J. *J. Pharm. Sci.* **1992**, *81*, 572.
28. Sztatisz J.; Szejtli J.; Gál S., eddig nem közölt eredmények.
29. Kaisersberger E.; Post E. *Thermochim. Acta* **1997**, *295*, 73.
30. Burnett D.J.; Thielmann F.; Sokoloski T. *J. Therm. Anal. Calorim.* **2007**, *89*, 693.
31. Madarász J, eddig nem közölt eredmények.
32. Komjáti B.; Madarász J.; Kolonits P.; Poppe L.; Nagy J., Babes-Bólyai Tudományegyetem, nyomdában.
33. Bartolomei M.; Cignitti MCotta-Ramusino.; M.; Iela M. T.; Soccorsi L. *Pestic. Sci.* **1994**, *41*, 91.
34. Senneca O.; Scherillo F.; Nunziata A. *J. Anal. Appl. Pyrolysis* **2007**, *80*, 61.
35. Szakács-Simon Zselyke, Diplomamunka, **2012**, BME, Budapest
36. Madarász, J.; Bombicz, P.; Jármí, K.; Bán, M.; Pokol, G.; Gál, S. *J. Therm. Anal. Calorim.* **2002**, *69*, 281.
37. Bán, M.; Madarász, J.; Bombicz, P.; Pokol, G.; Gál, S. *Thermochim. Acta* **2004**, *420*, 105.

38. Bán M.; Bombicz P.; Madarász J. *J. Therm. Anal. Calorim.* **2009**, *95*, 895.
39. NIST Chemistry Webbook, NIST Standard Reference Database Number 69, <http://webbook.nist.gov/chemistry/>
40. da Silva, R. D.; Semaan, F. S.; Novák, Cs; Cavalheiro, E. T. G. *J. Therm. Anal. Calorim.* **2013**, *111*, 1933.



## 3. Pásztázó tűszondás módszerek

*Nagy Péter Miklós, Kürti Jenő*

### 3.1. Bevezetés

A mikroszkópi leképezés fontos szerepét a természettudományok, gyógyászat és a technika területén bizonyosan nem kell hangsúlyozni. A „hogyan működik?” kérdés nem csak az egyes ember, de az emberiség gyermekkorában is megfogalmazódott, és végigkíséri életünket és történelmünket. Ez a megismerési vágy hajtja az Embert az egyre nagyobb és az egyre kisebb dolgok, jelenségek megismerésére, és ez követelte, követeli meg az ehhez szükséges eszközök, a távcsövek és mikroszkópok megalkotását és folyamatos fejlesztését. Mindkét eszközt nagyjából egy időben, a XVI-XVII. század fordulóján alkotta meg Galileo Galilei, Hans Lippershey és Zacharias Jansen. Ezek az eszközök hatalmas kaput nyitottak a tudományos megismerésre, terjedésük és fejlődésük mind a mai napig töretlen.

Az optikai mikroszkóp fejlődése a XIX. század második felében Ernst Karl Abbe munkásságával fordulóponthoz érkezett; egyrészt hatalmas technikai fejlődésen esett át, másrészt világossá váltak korlátai: az optikai mikroszkóp felbontása nem növelhető tovább, mint a fény hullámhosszának nagyjából fele (Abbe törvénye).<sup>\*</sup> Erre a kihívásra adott választ három műszer-család kifejlesztése a XX. században: az átvilágító (transzmissziós) elektronmikroszkóp (transmission electron microscope, TEM) az 1930-as évek, a pásztázó elektronmikroszkóp (scanning electron microscope, SEM) az 1960-as évek, és a pásztázó tűszondás mikroszkópok (scanning probe microscope, SPM) az 1980-as évek gyümölcse. Technikai tökéletesítésük napjainkban olyan szintre ért, hogy a TEM és az SPM alkalmas az atomi felbontásra, a SEM pedig ennek közelébe ért. Ezzel bizonyos értelemben befejezettek tekinthetjük a mikroszkópok fejlesztését: az atomok belseje már nem tanulmányozható, nem leképezhető, de nem is elképzelhető a szokásos képi ábrázolással, tehát a feloldás és a nagyítás további növelése már nem lehet a mikroszkópok fejlesztésének célja.

A felsorolt mikroszkópokat két nagy családba sorolhatjuk: az optikai és a transzmissziós elektronmikroszkóp képe a tárgy megvilágítása és optikai leképezése által jön létre, míg a pásztázó mikroszkópok (SEM

<sup>\*</sup> Arra, hogy ez még sincs kőbe vésve, hanem az Abbe-féle limit optikai módszerekkel is meghaladható, a legszebb bizonyíték a 2014. évi kémiai Nobel-díj, amelyet a szuperfelbontású fluoreszcens mikroszkópia kifejlesztéséért ítéltek oda.

és SPM,\* de pl. a konfokális mikroszkóp is) más elven működnek: egy parányi szondát mozgatnak a tárgy felületén, és az adott ponthoz rendelt képpont fényességét a szonda és tárgy közötti valamilyen kölcsönhatás erőssége szerint állítják be. Ebből a pásztázó mikroszkópok több fontos tulajdonsága következik:

- a képalkotásban nem játszik szerepet az optikai leképzés, tehát a felbontást sem korlátozhatja;
- a nagyítás annak következménye, hogy a tárgyon pásztázott terület sokkal kisebb, mint a kép;
- az így előállított kép csak laza kapcsolatban van (vagy akár semmilyen kapcsolatban sincs) a tárgy látható képével, az pusztán a tárgyról gyűjtött információk képszerű ábrázolása;
- ez a kép a tárgynak vagy mintának nem csak alakját, hanem más tulajdonságait is jellemezheti, pl. a kémiai összetételét bizonyos SEM-felvételeken, vagy akár elektronszerkezetét bizonyos STM-képeken.

Mi vezetett ezen különleges műszerek kifejlesztéséhez, és miért nevezzük ezeket mikroszkópoknak? A második kérdésre könnyebb a felelet: ezek az eszközök is a tárgy nagyított képét állítják elő, bár nagyon más elvek alapján működnek, mint a több száz éve használt mikroszkópok. Az általuk szolgáltatott „kép” gyakran nincs kapcsolatban azzal a képpel, amit abban az esetben látnánk, ha szemünk felbontását akkorára tudnánk növelni, mint ezen „mikroszkópok” felbontása, de mérési eredményeiket képszerű formában szolgáltatják, így könnyen értelmezhetőek képként. Az ilyen, tágabb értelemben vett mikroszkópok megalkotását a tudomány és technika, a mikroelektronika, az anyagtudomány, a biológia és az orvostudomány fejlődése kényszerítette ki. Talán nem véletlen, hogy a pásztázó tűszondás mikroszkópok családjának első tagját 1980/81-ben G. Binnig, H. Rohrer és munkatársaik az IBM Zürich melletti kutatólaboratóriumában fejlesztették ki,<sup>1,2</sup> amelyet pásztázó alagútmikroszkópnak neveztek el (Scanning Tunneling Microscope, STM). Ez a berendezés forradalmasította a mikroszkópiát és a felületanalízist, megalkotóinak nagyon rövid idő, alig 5 év alatt Nobel-díjat hozott, mivel eszközük a tudomány (és a mikroelektronika) égető kérdéseinek tisztázásában segített, mint például a szilícium-egykrisztály felületén tapasztalható, az elemi cella méretét lényegesen meghaladó méretű atomi átrendeződés (rekonstrukció) megismerése.\*

Ez az eszköz azután több, hasonló elven működő műszer, „mikroszkóp” megalkotásához szolgált példaként. Ebben a sorban az első kettő az atomi

\* Több, főleg angol nyelvű könyv foglalkozik az SPM-ek elméletével és gyakorlatával.<sup>3-5</sup>

erőmikroszkóp (Atomic Force Microscope, AFM)<sup>6</sup> és a pásztázó optikai közeltér-mikroszkóp (Scanning Near-Field Optical Microscope, SNOM).<sup>7</sup> Bár az SPM-ek családja napjainkban több mint 30 tagot számlál, a felsorolt 3 típus adja ma is az SPM-es vizsgálatokkal elért tudományos eredmények nagy többségét. Mindegyikük többféle működési módban alkalmazható, ez a sokféleség az – a hatalmas nagyítás mellett –, ami nélkülözhetetlenné teszi ezeket a biológus, orvos, vegyész vagy anyagtudós számára. Ebben a fejezetben ezeket a mikroszkópokat ismertetjük először egy rövid technikai leírásban, majd különböző szempont alapján válogatott alkalmazásokon keresztül.

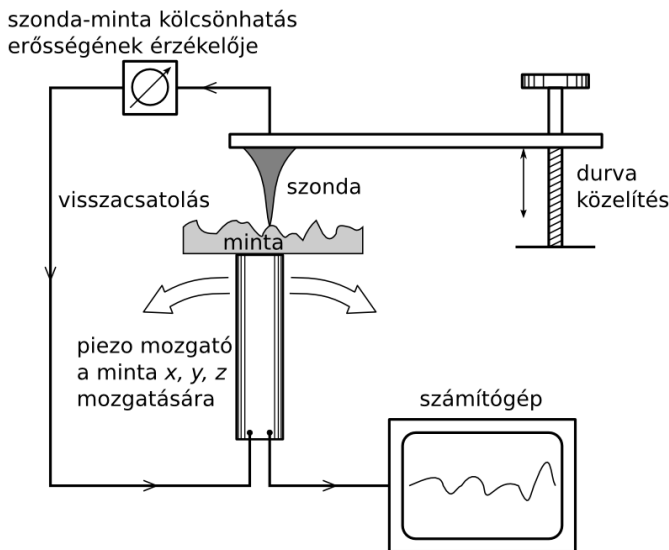
A pásztázó tűszondás mikroszkópok működése két alapvető elven nyugszik: a pásztázás és a közeltér-kölcsönhatás elvén. A két elv együttesen teszi lehetővé, hogy megfelelő szonda és kölcsönhatás választása esetén egy-egy képpont információtartalmát egyetlen atom elektronfelhőjének töredék része határozza meg, így a mikroszkóppal az anyag atomi, sőt szubatomi felbontással vizsgálható. A fent említett első alapvető elv azt jelenti, hogy ezekben a mikroszkópokban a képet képpontról képpontra haladva tapogatójuk le egy precíziós mozgatómechanizmus segítségével, a második pedig azt, hogy a képjel kialakulásában, a mozgatás vezérlésében és a feloldás meghatározásában a szonda-minta közti közeli kölcsönhatás meghatározó szerepet játszik. Az ilyen működés során alkalmazható kölcsönhatásokat később ismertetjük részletesebben, először a közös funkciókat, a szonda szabályozott mozgatását, a kölcsönhatás-erősség szabályzójellel alakítását és a kép számítógépes előállításának módját mutatjuk meg.

## **3.2. A pásztázó tűszondás mikroszkóp működési elve**

Az optimális működés biztosítása érdekében valamennyi SPM néhány általános konstrukciós elvet követ függetlenül attól, melyik típushoz tartozik, illetve milyen márka gyártmányaként kerül piacra. Ezen elveket az alábbiakban foglaljuk össze:

- a szonda biztonságosan megközelítse a mintát (durva közelítés);
- a szonda a minta felett, annak felületével párhuzamosan, megfelelő távolságban, kis lépésekben pásztázzon (finom mozgatás);
- a képjelként választott mérési adatok könnyen értékelhető vizuális formában jelenjenek meg a képernyőn a mérés folyamán;

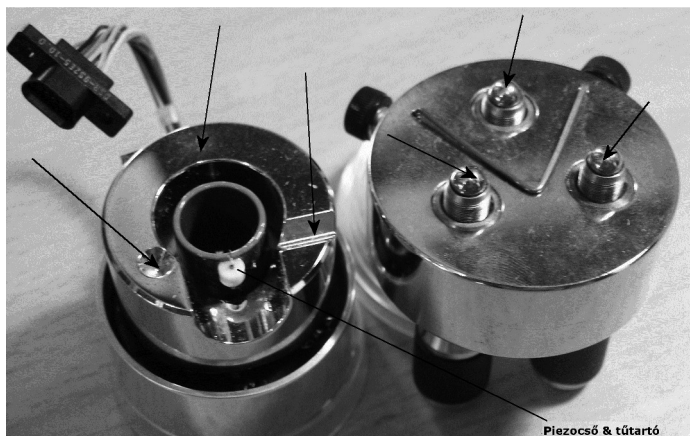
- és végül, de nem utolsó sorban, a berendezés mechanikus és elektromos-elektronikus zaja olyan alacsony szinten maradjon, hogy ne okozzon jelentős zajt a képjel(ek)ben.



3.1. ábra. A pásztázó tűszondás mikroszkóp általános felépítése

Egy pásztázó tűszondás mikroszkóp általános elvi felépítését a 3.1. ábra szemlélteti. A szerkezet lényegében egy merev vázba épített piezomozgatóból áll. A vázban meg kell oldani a szonda és a minta közelítését, erre leggyakrabban három, gömbben végződő menetes orsót használnak. A hárompontos alátámasztás mechanikailag a legstabilabb, de az SPM-ek konstrukciójában ezt egy különleges megoldással is javítani szokták, ahogy azt a 3.2. ábrán megfigyelhetjük. A 3 gömb egyike kúpon fekszik fel, és ezzel a 3 translációs mozgási szabadsági fokot határozza meg, a második egy vágaton fekszik 2 rotációs mozgást blokkolva, a harmadik egy síkfelületen nyugszik a 3. rotációs mozgást akadályozza meg. Ezzel a váz pozíciójának mind a hat szabadsági foka meghatározott, méghozzá úgy, hogy a szerkezetben nem ébrednek feszültségek, melyek relaxációja a mérés során képhibát, „kúszást” okozhatna. A szonda mintához való durva közelítése a csavarok emelésével vagy süllyesztésével történik. A 3.2. ábrán bemutatott szerkezetben két menetes orsó segítségével a szondát a minta közvetlen közelébe juttatjuk, majd az automatikát bekapcsolva egy léptetőmotor a harmadik csavar segítségével elvégzi a közelítés végső szakaszát. A közelítés során a finommozgató-mechanizmus (általában

piezoelektromos elven működő\* szerkezet, gyakran egy egyszerű piezokerámia cső)  $z$  irányban kinyújtott állapotban van, majd elérve azt a minta-szonda távolságot, ahol az SPM típusára jellemző kölcsönhatás erőssége eléri az előre beállított értéket, az automatika a közelítést leállítja. Fontos, hogy a finom mozgató szabályozása képes legyen a durva mozgató leállása alatt a piezocső kinyúlását oly mértékben csökkenteni, hogy a szonda hegye ne sérüljön. Ez a pásztázó alagútmikroszkópok esetében gyakran próbára teszi a szabályozás sebességét.

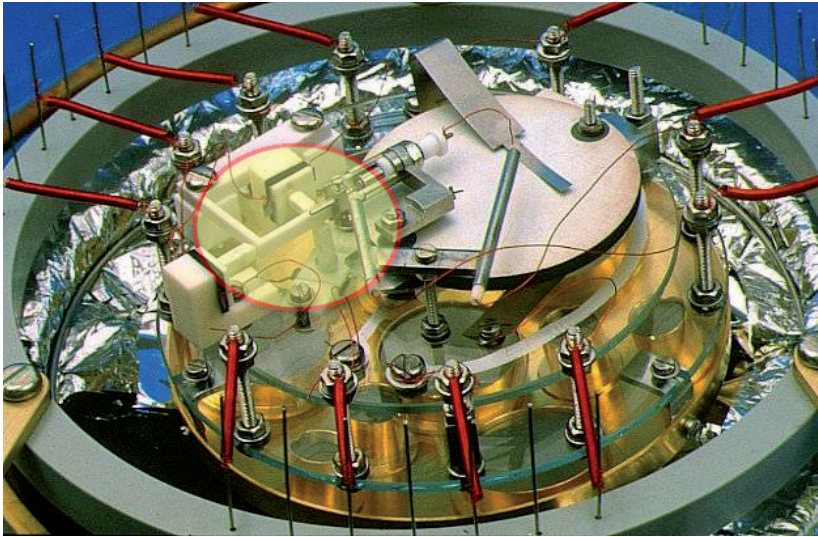


3.2. ábra. A pásztázó tűszondás mikroszkóp váza szétszerelve. A közelítést végző gömbben végződő csavarok is megfigyelhetők (jobboldali alkatrészen nyilakkal jelölve). A kúpos, árkos és sík fészkek a baloldali alkatrészen vannak nyilakkal jelölve. A piezocső és a palástjára ragasztott tűtartó is jól látható

A piezokerámia alapú finom mozgató, azaz pásztázóelem alkalmazása lényegében az STM feltalálása óta általános. Kezdetben ún. „TriPod” háromágú mozgatókat alkalmaztak (3.3. ábra).

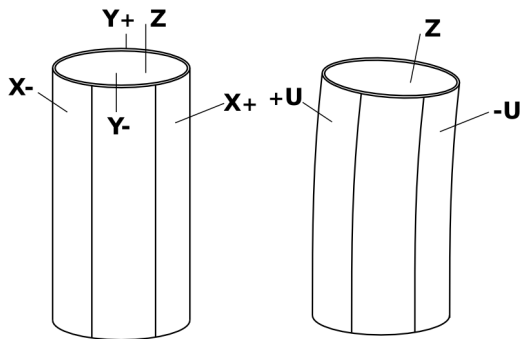
A „TriPod”-okat a piezocsövek kb. egy évtized után csaknem teljesen kiszorították, mivel a szokásos méretű piezokerámiák nemlinearitással, hiszterézissel és más, időfüggő hibákkal terhelt feszültség-elmozdulás-függvényét legegyszerűbben a csövek alkalmazásával lehet linearizálni: azonos elmozdulás a csövekben kb. tized akkora deformációval jön létre, mint a „TriPod” elrendezés esetén. A cső elrendezés további előnye a nagyobb mechanikai stabilitásban, könnyebb gyárthatóságban keresendő. A piezocső külső palástján négy negyedre osztott, belső palástján pedig egybefüggő fémbevonat található. A belső fémbevonatot földelve és a

\* A piezoelektromos hatást mutató anyagok elektrosztatikus tér hatására megváltoztatják alakjukat: a térrel párhuzamos irányban megnyúlnak vagy összehúzódnak, míg a másik két irányban fordítva, összehúzódnak vagy megnyúlnak.



3.3. ábra. „TriPod” háromágú mozgató Binnig és Rohrer első STM-jének modelljében. (Az eredetit szétbontották)

külső palást egymással szemben fekvő kvadránsaira ellentétes feszültséget kapcsolva a cső meggörbül, a cső vége a csőtengelyre merőlegesen elmozdul (3.4. ábra). Ezzel a mozgással áll elő az  $x$ - $y$  pásztázás. A  $z$  irányú mozgást vagy a belső palást feszültségének változtatásával, vagy a cső szonda felőli végén kialakított  $z$  mozgató gyűrűre kapcsolt feszültséggel állítjuk elő.

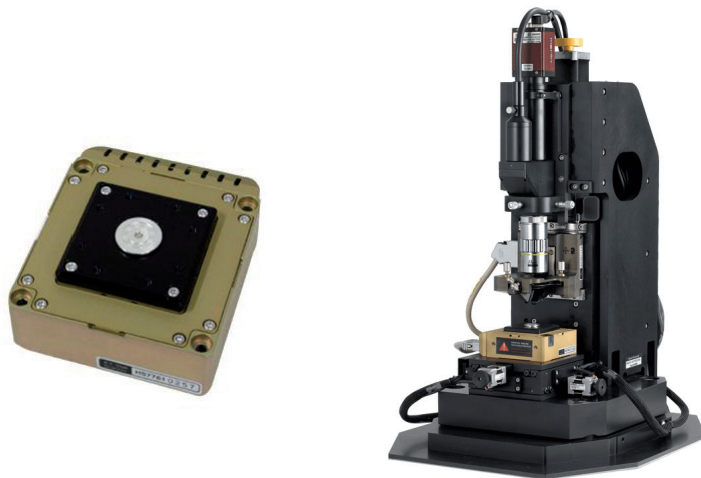


3.4. ábra. A piezocsöves szkennerek felépítése és működése

Egy újabb évtized elteltével, az utóbbi évtizedben a finommozgatóelemek linearitásának további növelése céljából a „stage” rendszerű, három független, visszacsatoltan szabályozott tengellyel rendelkező mozgatók



terjednek. Ezek a „TriPod” és piezocső mozgatókhöz képest komoly finommechanikai és elektronikai elemeket tartalmaznak, a mozgást „piezo stack” vagy bimorf típusú mozgatók generálják.



3.5. ábra. Korszerű 50  $\mu$ -os  $x$ - $y$  „flat scanner” képe és a felhasználásával működő AFM (forrás: <http://parksystems.co.kr>)

Fontos konstrukciós szempont az SPM-ek tervezésekor a műszer vázának merevsége: az egyes alkatrészek rezgése kicsi amplitúdójú és jól csillapított kell, hogy legyen. Az SPM-ek  $z$  irányú feloldására a 0,005 nm,  $x$ - $y$  irányúra pedig a 0,05 nm jellemző, ez természetesen csak akkor valósulhat meg, ha a szerkezet rezgései ennél lényegesen kisebbek. Tanulságos ezen adatokat az interferométereknél megengedett negyed hullámhossz, azaz kb. 100 nm-es rezgésekkel összevetni. A másik oldalon az SPM-berendezések elhelyezésénél is fontos szempont a rezgésmentes környezet, gyakran pneumatikus vagy elektromechanikus rezgésmentesítést alkalmaznak a környezeti rezgések csillapítására, de sok esetben egy egyszerű rugalmas felfüggesztés is megfelelő eredményt ad a rezgések képen megjelenő hatásának kiküszöbölésére.

Az SPM szerkezetét döntően befolyásolja, hogy a szonda vagy a minta kerül-e a piezomozgatóra. A kérdést praktikus szempontok alapján döntenek el. Ha az adott SPM-et nagy tömegű minták vizsgálatára tervezték, akkor általában a szonda mozog, ha a minta mérete és tömege korlátozott, akkor a mikroszkóp konstrukciós elvei a döntőek. Az egyszerűség általában a szonda mozgatása mellett szól, mert így a minta behelyezését és a mikroszkópba való rögzítését egyszerűbb megoldani, de pl. AFM-

ben a minta mozgatása az előnyösebb, mivel így a fénymutató optikája egyszerűbb lehet, nem kell optikailag kompenzálni a szonda lézerdiódához és a detektorhoz viszonyított pásztázó mozgását. A viszonylag nagy méretű és teherbírású „flat scanner”-ek elterjedésével a legújabb műszerek szinte kizárólag a mintát mozgatják az (ebben a két irányban) álló tű alatt, mialatt a  $z$  irányú mozgást a tűszonda végzi, ezzel elektromosan és mechanikusan is függetleníti az  $x$ - $y$  pásztázást a domborzat  $z$  irányú követésétől (3.5. ábra).

A piezokerámia alapú mechanikus mozgatók alkalmazása okozza a pásztázó tűszondás mikroszkópok két jelentős hátrányát más mikroszkópokkal szemben: a lassú képalkotást és a nagyjából 100-200  $\mu\text{m}$ -re korlátozott legnagyobb képméretet (vagy nagyjából  $N = 1000$ -szeres legkisebb nagyítást). A szonda csúcsát valamennyi SPM-ben a minta felülete felett néhány tized nm távolságban kell mozgatni, a minta domborzatától függetlenül. A felületbe ütközés a tűszonda (és a minta) károsodásával járhat (pl. STM esetén), a nagyobb eltávolodás pedig a képalkotás megszűnését okozhatja. A nagy pásztázási sornfrekvencia és a nagy pásztázott kép ellentmondásos követelményeket támaszt az elektromechanikus szabályzással szemben: a minta egyenetlenségei felett viszonylag „nagy” (de azért  $< 1 \text{ mm/sec}$ ) sebességgel mozgó tűszonda ütközésmentes mozgatása megköveteli, hogy nagyon gyorsan, nagyon nagy elmozdulásokra legyen képes a tű hegye, szaknyelven fogalmazva magas átviteli határfrekvenciát és nagy nyílthurkú erősítést biztosítson a szerkezet. Az átviteli frekvenciát a rendszer legalacsonyabb mechanikus rezonanciafrekvenciája határozza meg, ami nagyméretű ( $\approx 100 \mu\text{m}$ ) piezomozgatóknál 1 kHz körüli érték, a nagy nyílthurkú erősítés pedig az elektromos és mechanikus öngerjedés valószínűségét növeli meg. Így nehéz olyan konstrukciót alkotni, ahol a pixelről-pixelre ugrás frekvenciája meghaladja az előbb említett 1 kHz-et, illetve ahol 3-4 Hz-nél nagyobb sornfrekvencia alkalmazható. Ez az oka annak is, hogy az SPM technikában gyakori a  $256 \times 256$  képpontból álló kép, de még a  $128 \times 128$ -as képek is előfordulnak: nagy ára van a képpixelszám emelésének, ezzel arányosan nő minden egyes kép felvételének ideje is!

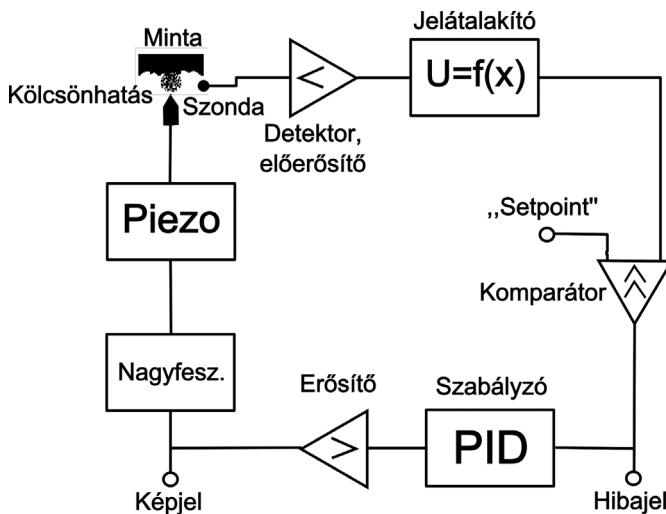
Az elektromechanikus mozgásvezérlő legalább olyan fontos eleme a pásztázó tűszondás mikroszkópoknak, mint maga a mozgó mechanizmus: egyrészt ez biztosítja, hogy a tű ne ütközzön a mintával, ilymódon károsítva mindkettőt; másrészt ez állítja elő a képelet, amit egy digitális kép előállítására használunk fel. Ez a mozgásvezérlő egy visszacsatolt szabályzó kör, ami, miközben az  $x$ - $y$  pásztázás előírt program szerint halad, folyamatosan biztosítja, hogy a tű hegyén a kiválasztott



fizikai kölcsönhatás (alagútáram, „cantilever” lehajlása, fényerősség stb.) nagyjából állandó intenzitású legyen. Mivel minden szabályzó kör (3.6. ábra) úgy működik, hogy ha a szabályozott jel megváltozik, azaz hibajel keletkezik, beavatkozik a jel helyreállítása érdekében, ezért a kölcsönhatás intenzitása a szabályzó kör beállításától függően kicsit változik, ez generálja az SPM-ek kétféle képjelét:

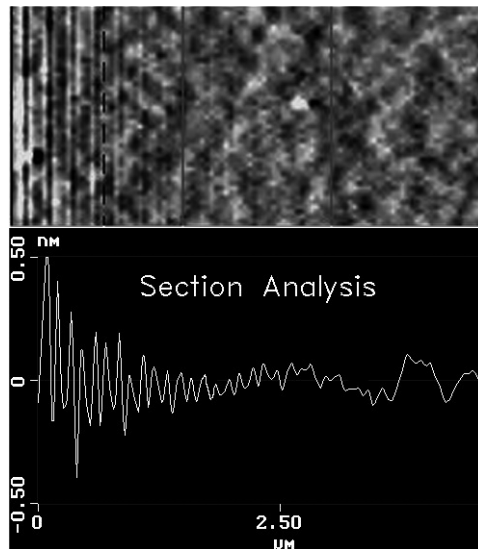
- „domborzati” képet a szonda-minta kölcsönhatás állandó értéken tarása útján, vagy
- „kölcsönhatás” képet a szondát a minta felületével párhuzamos síkban pásztázva.

Az első esetben a szabályzó elektronika úgy változtatja a szonda  $Z$  magasságát, hogy az adott kölcsönhatási paraméter állandó maradjon, képjelnek pedig a  $Z$  irányú piezomozgatóra adott feszültséget tekintjük. A második esetben a  $Z$  piezomozgató állandó vagy lassan változó feszültséget kap, a képjelként pedig a kölcsönhatás erősségével arányos elektromos jelet alkalmazunk. Ez különleges jelleget kölcsönöz az SPM-szabályzásnak: a szabályozott jel és a szabályzás hibajele egyaránt a rendszer kimenőjelét jelentheti. A valóságban egyik képalkotási modellt sem lehet megvalósítani tiszta formában, mindig megjelenik egy gyenge „kölcsönhatási” kép a „domborzati” kép felvételekor, és fordítva. Ha a „kölcsönhatási” kép hordozza a fő információt a mérés során, és a túl biztonságos távolságban van a mintától, lehetőség van a pásztázási sebesség jelentős növelésére, egy-egy kép felvétele azonban így is nagyjából 1 percig tart.



3.6. ábra. Az SPM-szabályzás általános blokkdiagramja

Az SPM-technika kifejlesztése nagyjából egybeesik a személyi számítógépek (PC-k) megjelenésével, és ezek a kis számítógépek nagyon hamar alkalmassá váltak az SPM-képek felvételére, megjelenítésére, feldolgozására és kiértékelésére. Ezért néhány kezdeti próbálkozást leszámítva valamennyi, a kereskedelemben megjelent készüléket PC vezérel, és a kép a PC képernyőjén jelenik meg. Ez a megoldás lehetővé teszi, hogy a szabályzási feladatokat ne analóg szabályzóval oldják meg, hanem ugyanezt a feladatot mikroprogramozott processzorral kombinált adatgyűjtő kártya végezze, ami nemcsak a fejlesztési és gyártási költségeket csökkenti, hanem rugalmasabbá teszi a berendezést. Például elterjedt megoldás, hogy a piezomozgatók linearizálását a piezocsőre adott feszültség ellentétes hatású nemlinearitásával kompenzálják, ami a probléma bonyolultságára való tekintettel elképzelhetetlen lenne analóg elektronikai megoldással. A felhasználó szempontjából ez a bonyolult rendszer egyszerű P vagy PID (proporcionális, integráló, deriváló) szabályzóként jelenik meg, ahol a szabályzási paramétereket úgy kell megválasztania, hogy a magassági jel „túllövések”, illetve lokális rezonanciák nélkül kövesse a minta felszínét, és a hibajel (a „kölsönhatási” kép) elhanyagolható legyen. A 3.6. ábra ezt a szabályzókört, illetve ennek analóg megfelelőjét szemlélteti.



3.7. ábra. A piezocső rezonanciája által okozott képhiba

A 3.7. ábra olyan hibát mutat be, ami a pásztázó tűszondás mikroszkópokban alkalmazott mechanikus pásztázásnak a következménye. Felül egy SPM-kép részlete látható, alatta pedig a kép átlagos intenzitása

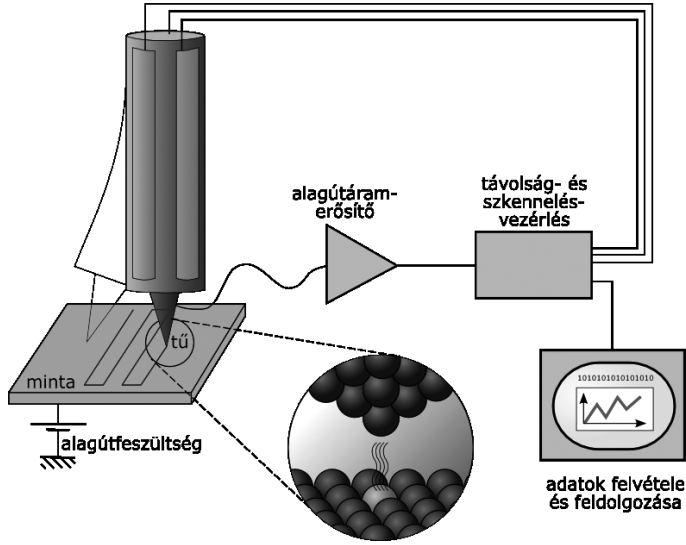
a vízszintes tengely mentén. Jól megfigyelhető, hogy a kép bal szélétől csillapodó rezgés indul, ami nagyjából 1,5-2  $\mu\text{m}$  széles sávban eltorzítja a képet. Ezt a jelenséget az okozza, hogy ezt a viszonylag kis nagyítású képet gyors pásztázással vettük fel, ezért a sorvégi fordulónál a piezocsőben rezgés gerjed. Ez a cső hosszváltozásával jár, és így nyomot hagy a felvett képen. A jelenség oka az SPM-re jellemző mechanikus pásztázás, az ilyen hibákat az SPM működési paramétereinek optimalizálásával csökkenteni lehet, de nem lehet teljesen kiküszöbölni.

Általánosságban elmondhatjuk, hogy egy átlagos állapotban lévő SPM képen mérhető, bármilyen távolságra vagy kölcsönhatásra jellemző paraméter nagyjából 5-10% pontosságú. Ezt minden esetben vegyük figyelembe, amikor ilyen paramétereket SPM-es méréssel határozzunk meg, mert sajnos általános, hogy a műszer szoftvere ennél lényegesen pontosabbnak látszó adatokat szolgáltat. Ez ne tévesszen meg bennünket, a mérés hibája nem azonos a műszerbe épített A/D konverter legalacsonyabb bitjének értékével!

### 3.3. Pásztázó alagútmikroszkóp

A pásztázó alagútmikroszkópot (Scanning Tunneling Microscope, STM) 1981-ben fejlesztette ki G. Binnig és H. Rohrer,<sup>1</sup> felfedezésüket 1986-ban Nobel-díjjal jutalmazták. Ennél a műszernél a mikroszkóp működését vezérlő kölcsönhatás a tű és a minta között folyó alagútáram, ami az alagútjelenségnek köszönhető, és erőssége exponenciálisan függ a tűtávolságtól, nagyban megkönnyítve az állandó tű-minta távolság tartását a pásztázás során (3.8. ábra).

Az STM-ben a minta és a tűszonda között az előfeszítő feszültség (ún. „bias” feszültség) hatására folyó alagútáramot használjuk képalkotásra.<sup>8-10</sup> Az alagútáram a kvantummechanikai alagúteffektus következtében folyó áram, ennek magyarázatára szolgál a 3.9. ábra. Feltesszük (szokásos műszerekben tényleg ez a helyzet), hogy a tű és a minta közötti távolság elegendően nagy ahhoz, hogy a két fémdarabban az elektronállapotok függetleneknek tekinthetők. Ekkor, amint azt a 3.9. ábra szemlélteti, a két fémben a Fermi-szintek  $\delta = eU_b$  energiával eltolódnak ( $U_b$  az előfeszítő feszültség,  $e$  az elektron töltése), lehetőséget teremtve az elektronoknak az egyik oldal betöltött állapotaiból a másik oldal betöltetlen állapotaiba való mozgására. Az áram azonban a klasszikus felfogás szerint nem indulhat meg, mert az elektronoknak egy potenciálgáton kell átjutniuk, melynek magasságát a két fém kilépési munkája ( $W^A$ ,  $W^B$ ), szélességét



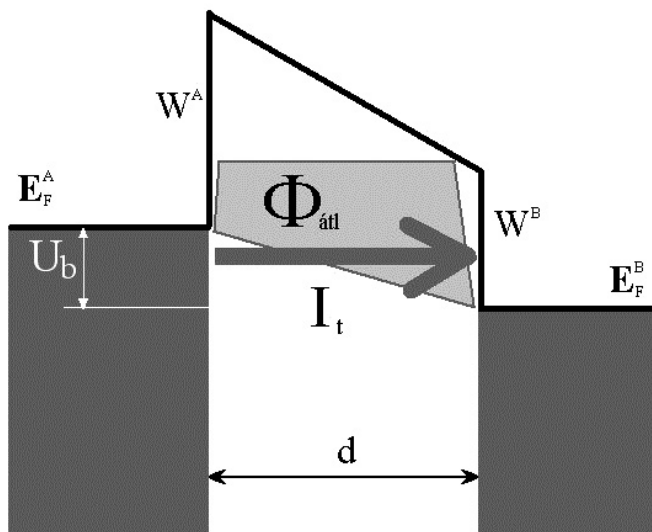
3.8. ábra. A tű és a minta kölcsönhatása

pedig az elektródok távolsága határozza meg (megint csak a minta és szonda „elegendően” nagy távolságát feltételezve). Az ábrán ezt a potenciálgátat lineáris közelítésben a vastag vonallal jelölt világosszürke trapéz ábrázolja. Mivel azonban a kvantummechanikai felfogás szerint az elektront egy (viszonylag) kiterjedt hullámfüggvény írja le, amely „átlóghat” a potenciálgát túoldalára, a két fém között „alagútáram” indul, melynek nagyságát a trapéz alakú gát esetén közelítőleg érvényes

$$I_t \propto \rho_a \rho_b \frac{U_b}{d} e^{-Ad\sqrt{\Phi_{\text{atl}}}} \quad (3.1)$$

kifejezés adja meg, ahol  $\rho_a, \rho_b$  az elektronok, illetve a lyukak állapotsűrűsége a két fém Fermi-nívója közelében,  $\Phi_{\text{atl}}$  a potenciálgát átlagos magassága,  $U_b$  az előfeszítő feszültség,  $d$  a minta és a szonda távolsága, az  $A$  állandó értéke pedig  $\sim 1 \text{ \AA}^{-1} \text{ eV}^{-1/2}$  ( $\sim 10 \text{ nm}^{-1} \text{ eV}^{-1/2}$ ).

Figyelembe véve, hogy az STM-ben a *szonda* hegyén nem változhat a kilépési munka és az állapotsűrűség, az alagútáram a minta-szonda távolság mellett a *minta* lokális állapotsűrűségétől és lokális kilépési munkájától függ. Így állandó áramú üzemmódban (ez felel meg az általánosságban említett állandó kölcsönhatásnak) az állapotsűrűség változásai a minta domborzatába transzformálódnak, az állandó  $\rho_a(\mathbf{r}, E_F)$  felületeket letapogató STM apró dombocskákkal, míg állandó magasságú üzemmódban árampúppokkal ábrázolja az atomokat. Ez az atomi felbontás

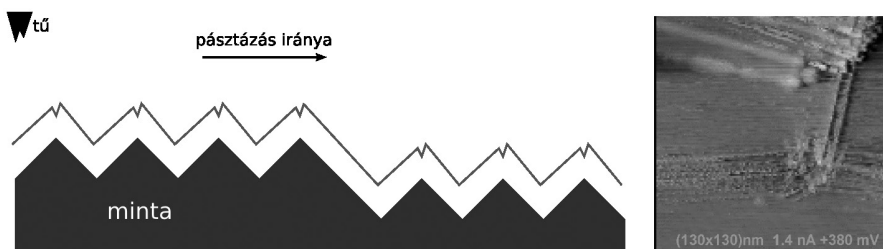


3.9. ábra. Az alagútáram létrejöttének sematikus rajza

azonban csak akkor jöhet létre, ha a szonda hegye valóban egyetlen pontban vesz mintát a lokális elektronállapot-sűrűségből, azaz egyetlen atom ül a tű hegyén. A kép atomi korrugációja\* akkor is létrejöhet, ha a szonda hegyét több atom képezi, ez a kép azonban több atomi felbontású kép összege. A 3.10. ábrán egy ilyen esetet mutatunk be egy rosszabb felbontású képen. A többszörös hegyű STM-tű a grafit hexagonális lapján az atomi lépcsőt az egymás melletti csúcsoknak megfelelően két kisebb magasságú lépcsőként jeleníti meg, a lépcső egyrészt a csúcsok magasságkülönbségéből, másrészt a lépcső tetején maradt egyik csúcson folyó teljes (az adott csúcsra vonatkoztatva nagyjából megduplázódó) áram miatti tűtávolság-csökkenésből ered.

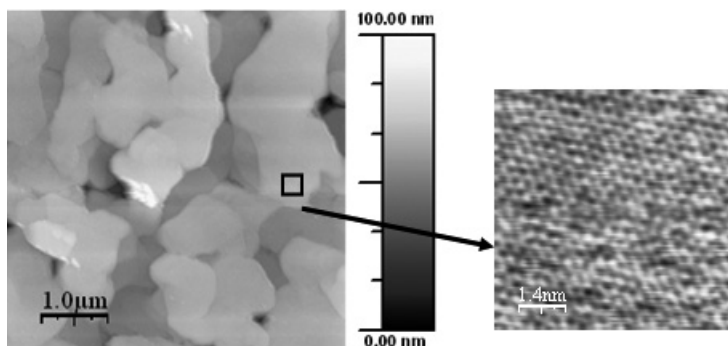
Mivel az STM-ben a jellemző kölcsönhatás, az alagútáram, minimális, de véges vezetést igényel, az STM-mel csak vezető vagy félvezető minták vizsgálhatóak. A 3.11. ábra csillámra gőzöltetett aranyréteg STM-felvételét mutatja. Baloldalon a kialakult teraszok morfológiája tanulmányozható, a jobboldalon pedig a megjelölt terület atomi feloldású képe látható. Fémekről nehéz atomi feloldású képet készíteni, mivel

\* A korrugáció a sík felületű mintán a képjelben tapasztalható vagy a domborzatától függetlenül megjelenő hullámosság. A felület atomi szerkezete okozza azt, hogy a nagyobb elektronsűrűségű helyeken (az iontörzsekhez közel) az alagútáram megnő, vagy (ennek kompenzálására) a tű magasabbra emelkedik; és fordítva, alacsony elektronsűrűségű pozíciókba, az iontörzsektől távolabb az alagútáram csökken, vagy a tű lesüllyed.



3.10. ábra. STM-felvétel többhegyű tűszondával

gyakran legalább részlegesen szigetelő oxidréteggel fedettek, ami néhány pásztázás során a tű roncsolódásához vezet. Például alumíniumról a natív oxidréteg miatt lehetetlen STM-képet készíteni még (nem túl jó) vákuumban is a visszamaradt oxigén oxidáló hatása miatt. Természetesen ez a probléma az arany esetében nem áll fenn, de az arany atomi korrugációja több más fémhez hasonlóan nagyon kicsi, így csak nagyon jó jel/zaj arányú berendezéseken, nagyon tiszta körülmények között lehet megjeleníteni atomi feloldású képet.

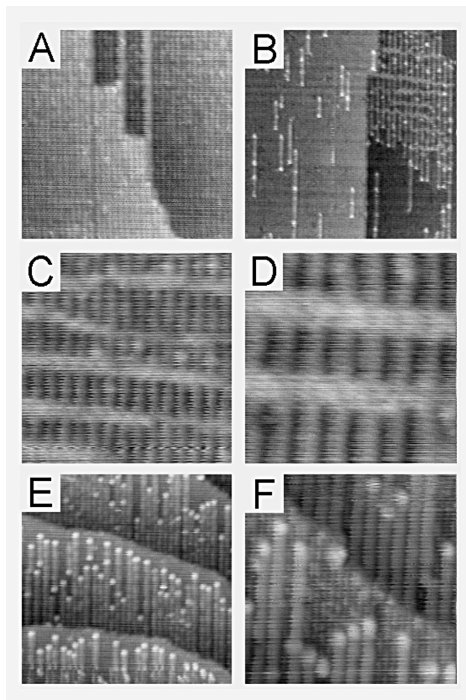


3.11. ábra. Csillám felületére párologtatott aranyréteg STM-felvétele (1 nA, 0,8 V), és atomi felbontás ugyanezen a felületen (0,3 nA, 0,250 V)<sup>11</sup>

### 3.3.1. Vákuum alatt működtetett mikroszkópok

A hagyományos felületvizsgálati módszerek sokszor csak vákuumban alkalmazhatók, mivel ezek a vizsgálatok általában valamilyen részecske-sugárral vannak kapcsolatban. A pásztázó tűszondás mikroszkópok nagy előnye, hogy nem igényelnek vákuumot, így olcsóbbak, mint pl. az elektronmikroszkópok. Ez a tulajdonság azonban nem előny minden szempontból, mivel a vákuum a felület tisztaságát is biztosítja. A hagyományos felületvizsgálati módszerek közül sok valamilyen

diffrakciós jelenséget alkalmaz a felület szerkezetének vizsgálatára (pl. LEED, XRD), ezért csak (legalábbis nm-es skálán) periodikus felületi morfológiákat tud kimutatni. Ezzel szemben az SPM nagy előnye, hogy lokális módszer, néhány száz atom elhelyezkedését is meg tudja határozni, ezért aperiodikusan ismétlődő alakzatok feltárására is alkalmas.



3.12. ábra. Rutilszerkezetű  $\text{TiO}_2$  felületen végbemenő atomi átrendeződések<sup>12</sup>

A katalízis-alap kutatásokban nagy jelentősége van a rutilszerkezetű  $\text{TiO}_2$  ún. felületi rekonstrukciós formáinak, azaz felületen végbemenő atomi átrendeződéseinek. Ezenkívül ez az anyag ugyan nem elektromos vezető, de vákuumban hőkezelve kevés oxigént veszít, és félvezetővé, STM-mel vizsgálhatóvá válik. A 3.12. ábrán egy ilyen vizsgálat eredményei láthatók.<sup>12</sup> Az (A) képen a függőlegesen ([001] kristálytani irányban), egymástól 1,3 nm távolságban futó sorok (1x2) elrendeződésre utalnak, amelyről kimutatták, hogy egy redukált ( $\text{Ti}_2\text{O}_3$ ) rendezett fázishoz rendelhetők. A (B) kép azt mutatja, hogy a különböző felületi rendezett fázisok egymás mellett is stabilan jelen lehetnek: a baloldali atomi lépcső alapvetően a tömbi fázisnak megfelelő (1x1) rendezettséget mutatja, néhány egydimenziós (1D redukált fázis) szerkezettel dekorálva; a jobboldali atomi lépcső egy erősen redukált ún. keresztcsíkos (1x2)-es fázist mutat.



Mindkét kép  $50 \times 50 \text{ nm}^2$  méretű. A (C) és (D) képek (képméret  $20 \times 20 \text{ nm}^2$ , ill.  $10 \times 10 \text{ nm}^2$ ) ezen utóbbi fázist felnagyítva jelenítik meg: a függőleges sorok  $1,3 \text{ nm}$  távolságban  $[001]$  irányban futnak, a közel vízszintes keresztsorok viszonylag szabálytalan távolságban, de irány szerint közel párhuzamosan haladnak. Az (E), (F) képek a tömbi rendezettségű  $(1 \times 1)$  felületen kifejlődő  $(1 \times 2)$  rekonstrukciókat mutatják két különböző képméretben ( $20 \times 20 \text{ nm}^2$ ,  $10 \times 10 \text{ nm}^2$ ). Jól látható, hogy a rekonstrukciós 1D vonulatok a lépcsőhelyeken, az alsó teraszokon fejlődnek ki. Ezzel a vizsgálattal a rutilszerkezetű  $\text{TiO}_2$  katalízisben aktív pontjait lehet megtalálni a különböző hőkezelések után, ami segít a katalízis során lejátszódó folyamatok jobb megértésében. Az ilyen katalitikus folyamatok a gyógyszeriparban is nagy jelentőségűek.

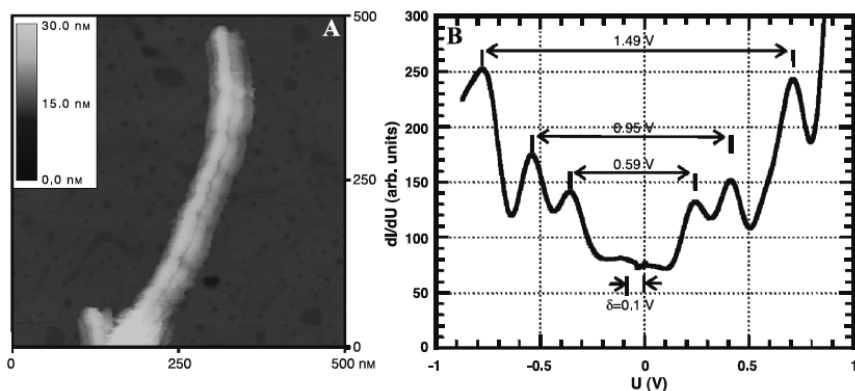
### 3.3.2. Pásztázó tűszondás spektroszkópia

Az STM a fent leírt képalkotó üzemmód mellett ún. spektroszkópiai üzemmódban is működhet (Scanning Tunneling Spectroscopy, STS). Ezeknek a méréseknek nincs köztük a klasszikus fényelnyelés jelenségén alapuló spektroszkópiához, azonban hozzásegítenek az anyag kémiai minőségének meghatározásához, ezért funkciójuk alapján (a pásztázó *mikroszkóp* elnevezéshez hasonlóan) némi joggal nevezzük azokat „spektroszkópiának”. Az egyszerűbben értelmezhető változat, az ún. Z-I spektroszkópia esetén a tűt a minta adott pontja felett (a merőleges) Z irányban rezgetjük, az alagútáram a tűtávolság függvényében exponenciálisan változik, és lineárisan függ a potenciálgát magasságától, amiből viszont a kilépési munka meghatározható [a (3.1) kifejezés alapján]. Az U-I spektroszkópia esetén a tűszondát a minta felett megállítva az előfeszítő feszültséget változtatjuk, ami az alagútáram arányos változását okozná a képlet szerint, ha az elektronok állapotsűrűsége a potenciál függvényében állandó lenne a mintában és a tűben. Mivel az alagútáramhoz hozzájáruló állapotok száma, a sáv szerkezeteknek megfelelően, erősen függ a feszültségtől, ezzel a módszerrel a minta sáv szerkezetét vizsgálhatjuk.<sup>13</sup>

Szép példája az STS alkalmazásának a nanoszerkezetek hazai kutatásában a 3.13. ábrán bemutatott, felületmódosított többfalú szén nanocsőről készült STM-felvétel és STS U-I spektrum.<sup>14</sup> A bal oldali képen (A) látható nanocső felett többször felvett, átlagolt, simított és derivált U-I görbe látható az ábra jobb oldalán (B).<sup>\*</sup> A görbe lokális maximumai, az ún. Van Hove-szingularitások, más feszültségeknél jelennek meg,

<sup>\*</sup> Egészen pontosan a – lokális állapotsűrűséget tükröző –  $dI/dU$  derivált görbe az  $U$  függvényében.





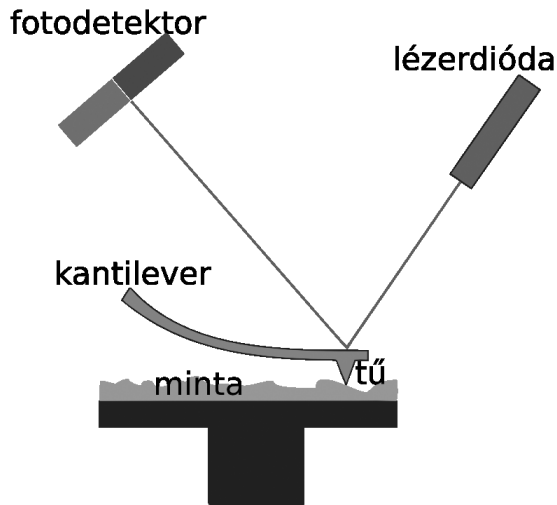
3.13. ábra. Többfalú szén nanocső STM-képe és STS-spektruma<sup>14</sup>

mint a nem módosított nanocsövek esetén, ami azt bizonyítja, hogy a felületmódosítás megváltoztatja a nanocsövek elektronszerkezetét. Más struktúrák vizsgálata során ezzel a módszerrel katalikusán, kémiaileg vagy biológiailag aktív gyökök helyét és jellegét lehet meghatározni, ami gyógyszerek hatásmechanizmusának tisztázásában lehet segítségünkre, természetesen kizárólag legalább részben vezető anyagok esetében.

### 3.4. Atomi erőmikroszkóp

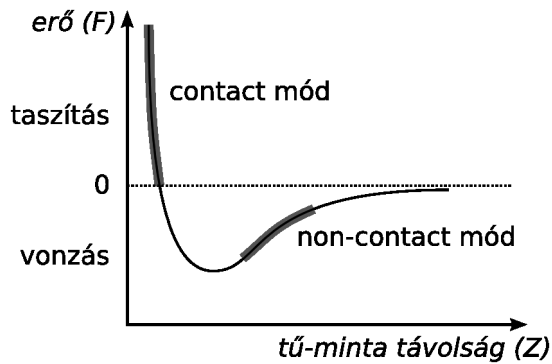
Binnig, Quate és Gerber 1986-ban publikálta az „Atomic Force Microscope” c. cikkét,<sup>6</sup> amely az atomi erőmikroszkóp (Atomic Force Microscope, AFM) születését jelentette az STM-ért odaítélt Nobel-díj átvételének évében. Ez a műszer az STM egy érdekes átalakítása volt, de nem ez a változat terjedt el, hanem egy fénymutatón alapuló kicsit később kidolgozott változat<sup>15</sup> (3.14. ábra). Egy lézerdíoda sugara a minta felületét pásztázó tühegyet tartó rugólapka („cantilever”, konzol) tükröző hátoldalára esik, ahonnan egy négyes osztású detektorra verődik vissza. A detektoron a fényfolt pozíciója a mintán levő dombot pásztázva feljebb kerül, a szabályzó elektronika pedig ilyenkor a mintát lejjebb (vagy a tűtartót feljebb) mozdítja. A domborzati kép ebből a szabályzófeszültségből alakul ki.

Az AFM-ben a szabályzást vezérlő kölcsönhatás a minta és a szonda között ható „atomi” erő. Ez az erő a szonda mintához való közelítése során először vonzó, majd taszító jellegű (3.15. ábra), és többféle erő (megosztási erők, Van der Waals-erők, Coulomb-taszítás stb.) keverékeként képzelhető el. Kezdetben a tűszonda és minta között ható Van der Waals-erők



3.14. ábra. AFM mérőfejének elvi szerkezete

vonzóak, ebben a tartományban ún. „non-contact” üzemmódú AFM-képek készíthetők: a szonda nem érinti a minta felszínét, de ha sikerül az állandó rugólapkalehajlás tartományában tartani a szonda-minta távolságot, úgy az AFM feltérképezi a minta domborzatát.

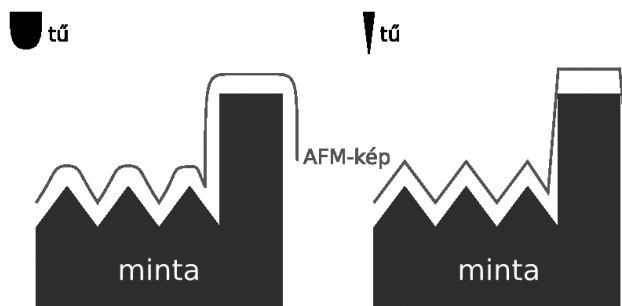


3.15. ábra. Az AFM-tű és a minta között ható erő a tű-minta távolság függvényében

Ezt a tartományt általában rezgetett szondával lehet stabil képalkotásra használni („non-contact” üzemmód). Továbbközeledve a minta felületéhez a taszító erők jutnak túlsúlyba az erőgörbén. Ebben a tartományban működik a normál, „contact” üzemmódú AFM, de az ún. kopogtató („tapping” vagy „intermittent-contact”) üzemmód is ezt az erőtartományt használja.

### 3.4.1. A megfelelő AFM-tű kiválasztása

A felhasználók többsége az AFM-tűket különböző gyártóktól vásárolja. Ezek a tűk sokféle alakúak és anyagukban eltérők lehetnek. Az adott mérési módhoz és mintához legmegfelelőbb tűfajtát érdemes kiválasztanunk. Hasonlóan az STM-tűkhöz, az ezekkel történő manipuláció során is nagyon óvatosan kell eljárunk, mert a rugólapka a nem szakszerű felhasználás esetén könnyen letörhet.



3.16. ábra. A tű alakja által okozott képtorzulás

A 3.16. ábra azt szemlélteti, miért is fontos a megfelelő tű kiválasztása, mivel a tű alakja nagyban befolyásolja azt, hogy mit is látunk az AFM-képen. Az első esetben (jobb oldal) az érdes felületet egy vékony, hosszú, keresztmetszetében alig szélesedő tűvel pásztázzuk. Az AFM-kép ebben az esetben a vizsgált felület tényleges domborzatához nagyon hasonló morfológiát jelenít meg. A másik tű – mérete miatt – a felület barázdáiba nem tud behatolni, és így a kép nem lesz hű mása a minta domborzatának (bal oldal). Gyakran előfordul, hogy a tű a minta felületéhez gyengén kötött részecskéket magához vonzza, azok a tű hegyére ragadnak. Ilyenkor a leképezés minősége akár egyetlen kép felvétele közben is nagymértékben romolhat, mivel ezután a tű hegyéhez tapadt részecske helyettesíti a tű hegyét. Ilyen, az adott feladatra nem megfelelő tűvel vizsgálva a felületet, téves következtetéseket vonhatunk le a minta felszínének szerkezetéről, érdekességéről.

### 3.5. A pásztázó tűszondás mikroszkópok bővülő családja

A pásztázó tűszondás mikroszkópok családja az AFM-konstrukció kialakulása óta folyamatosan bővül. Átlagosan évente 1-2 mikroszkóp

típust fejlesztettek ki, így a „családtagok” száma mára meghaladja a harmincat. Ezek közül ismertetünk itt néhányat:

MFM (Magnetic Force Microscope, *mágneses erőmikroszkóp*): egy olyan AFM, amelyen a szonda csúcsa ferromágneses anyaggal, pl. krómmal van bevonva, így a felületet pásztázva a nagyon rövid hatótávú Van der Waals-erők, nagyobb távolságban viszont a hosszabb hatótávolságú mágneses dipólkölcsonhatás határozza meg a rugólapka lehajlását. Ezzel a módszerrel pl. ferromágneses anyagok doménstruktúráját lehet vizsgálni vagy mágneses adathordozókon láthatóvá lehet tenni a biteket.

SCM (Scanning Capacitance Microscope, *pásztázó kapacitás-mikroszkóp* vagy Spreading Capacitance Microscope, *szórtkapacitás-mikroszkóp*): a vezető AFM-tű és a minta között mérjük az impedanciát a szonda és a minta közé kapcsolt váltófeszültség segítségével. Az SCM-kép az impedancia helyfüggése. Főleg félvezetők lokális tulajdonságainak feltérképezésére használják.

SNOM (Scanning Near-field Optical Microscope, *pásztázó optikai közeltérmikroszkóp*): a fénynek azon tulajdonságát használja ki, hogy a teljes visszaverődés esetén a közeghatáron az elektromágneses térerősség nem lépcsőfüggvény-szerűen, hanem exponenciálisan csökken (evaneszcens hullám): az exponenciális csökkenés tartományába vitt fényvezetővel ezt a lecsengő hullámot érzékelni lehet. A leggyakrabban használt SNOM egy olyan AFM, ahol az AFM-csúcs egyben egy kb. 10 nm átmérőjű blendében végződő fényvezető is. Az AFM konstans távolságra mozgatja a csúcsot az optikailag átlátszó minta felületétől, a csúcsból elvezetett fényt fotoelektron-sokszorozón felerősítve a minta optikai tulajdonságairól kapunk információt a fényhullámhossznál lényegesen jobb feloldásban. Ezzel a mikroszkóppal optikai mikroszkóp számára preparált metszetek vizsgálhatók az optikai leképzésnél sokkal jobb felbontással.

SThM (Scanning Thermal Microscope, *pásztázó termikus mikroszkóp*): a minta felett AFM-ként pásztázott termoelemmel méri a minta lokális hőmérsékletét. Ezt a változatot főleg félvezetők működésének jellemzésére, lokális felmelegedések meghatározására használják. Másik változatában akkora áramot hajtanak át a termoelemen, hogy a hegesztési pont felmelegszik, a hőt jelentős részben a minta vezeti el. Ilyenkor az SThM a minta lokális hővezetési tényezőjét méri.

SKM (Scanning Kelvin-probe Microscope, *pásztázó Kelvin-szonda mikroszkóp*): vezető bevonattal ellátott AFM rugólapkát rezget közvetlenül a minta felett, ezzel valósítja meg a Kelvin-szondát, ami a lokális kémiai potenciált elektrosztatikus úton határozza meg, tehát vákuumban is

alkalmazható. A módszerrel 10 nm feloldással lehet a kémiai potenciál lokális változásait vizsgálni.

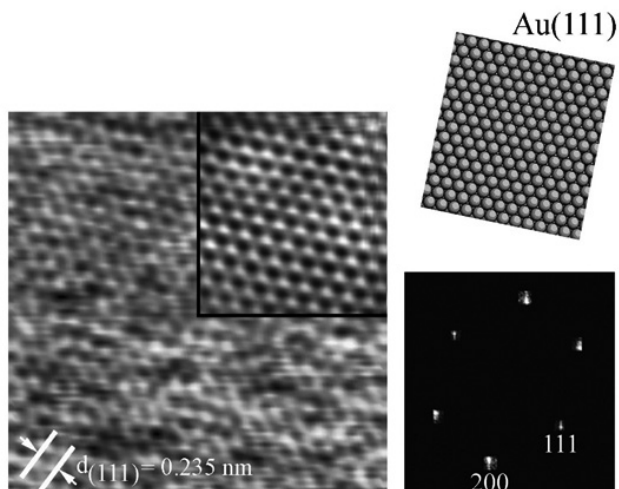
FMM (Force Modulation Microscope, *erőmodulációs mikroszkóp*): az erőmodulációs mikroszkópia a minta mechanikai tulajdonságainak jellemzésére szolgál. Periodikus jelet adva a tűre, a pásztázás közben a minta rugalmas tulajdonságai szerint változik a rugólapka amplitúdója, illetve fáziseltolódása.

PDM (Phase Detection Microscope, *fázisdetektálási mikroszkóp*): segítségével feltérképezhető a felületen a rugalmassági, az adhéziós és a súrlódási együttható változása. Mélni kell a rugólapkát gerjesztő jel és a rugólapka rezgése közti fáziseltolódást. A fáziseltolódás változása a különböző mechanikai tulajdonságú területeket jelzi a minta felületén.

EFM (Electrostatic Force Microscope, *elektrosztatikus erőmikroszkóp*): a minta felületén a töltéssűrűség változása térképezhető fel a segítségével. Feszültséget kapcsolnak a tű és a minta közé, a rugólapka lehajlása a felületi töltéssűrűségnek és a töltés polaritásának megfelelően változik.

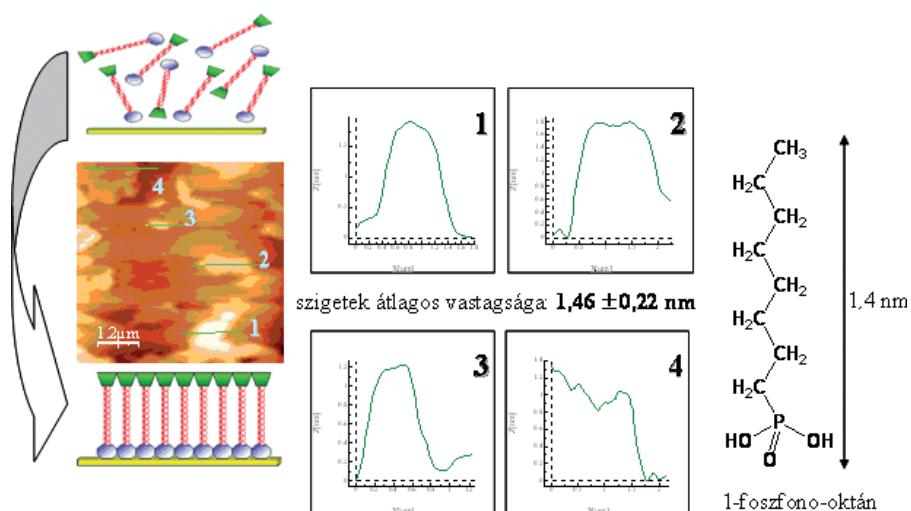
### 3.6. SPM-felvételek kvantitatív kiértékelése

Az SPM-felvételek kiértékelése során is gyakran alkalmazunk képfeldolgozó, képmódosító és képelemző eljárásokat. Mivel az SPM-felvételek az esetek túlnyomó többségében domborzati képek – vagy kalibrálhatóak úgy, hogy domborzati jelentésük legyen –, a jobb szemléltetés érdekében gyakran ábrázoljuk azokat térbeli, axonometrikus módon. Ez a leggyakrabban alkalmazott képfeldolgozó eljárás, ami nagyban hozzájárul az SPM népszerűségéhez, hiszen ezek a képek nagyon látványosak. A zajok csökkentésére, illetve a hasznos információk kiemelésére képmódosító eljárásokat, simításokat, élkimieléseket alkalmazunk, illetve a képet az ún. gyors Fourier-transzformációs módszerrel a fázistérbe transzformálva szűrjük ki a zajt, vagy emeljük ki a periodikus információkat. Erre példa a 3.17. ábra arany kristályrácsáról készült atomi feloldású képének elemzése. Az ábra bal oldalán az aranyfelületről készített STM-felvétel látható, melyen többféle zaj is megjelenik. A zaj eltüntethető Fourier-szűréssel (a jobb felső sarokban az így szűrt képet mutatjuk meg). A kép jobb oldalán a felvételtől számított Fourier-transzformált kép látható (jó közelítéssel ez a képen megjelenő kristálydarabka diffrakciós képének felel meg), valamint feltüntettük az arany kristályszerkezeti modelljét az STM-képnek megfelelően [011] szerint orientálva. A modell fehér golyói jelölik az aranyatomokat.



3.17. ábra. Az aranyfelület atomi feloldású STM-képe (a jobb felső sarokban a kép Fourier-szűrt képrészletével) a felvétel Fourier-transzformáltjával és az arany szerkezeti modelljével

Gyakran egyszerűen távolságokat mérünk a képen, mivel az SPM-képek a kép síkjában és arra merőlegesen egyformán jó feloldásúak. Lehetőségünk van pl. a kép jellegzetes pontjai távolságának, illetve jellegzetes vonalak mentén a magasságprofilnak (keresztmetszetnek) a meghatározására.



3.18. ábra. Csillám felületén önszerveződő oktánfoszfonsav-szigetek keresztmetszeti analízise<sup>16</sup>

Ezekkel a módszerekkel az  $x$ ,  $y$ ,  $z$  koordinátákat kb. 5-10% pontossággal határozhatjuk meg, ha pontosan végezzük a piezoelemek kalibrálását. A 3.18. ábrán a csillám felületén önszerveződő alkánfoszfonsav szigetek magasságprofilján mutatjuk be ezt a lehetőséget.<sup>16</sup>

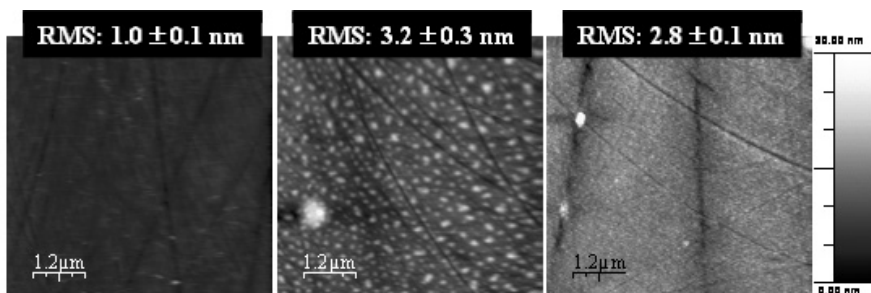
A keresztmetszeti analízisből kiderül, hogy a kialakult szigetek átlagos vastagsága 1,5 nm, amely nagyjából megegyezik a szigeteket alkotó molekulák hosszával. Ebben az esetben az AFM-felvétel megerősítette a más módszerekkel végzett mérések eredményét, miszerint a csillám felületén az alkánfoszfonsavak oldatából monoréteg alakul ki.

Gyakran alkalmazott paraméter a minta domborzatának jellemzésére az érdesség (roughness,  $R_{\text{RMS}}$ ). Ez matematikailag a kép minden egyes pixelében tárolt magasság érték ( $Z$ ) szórását jelenti, ami jól jellemzi a minta érdességének változásával járó folyamatokat (3.19. ábra). Meghatározása a következő képlet alapján történik:

$$R_{\text{RMS}} = \sqrt{\frac{\sum(Z_i - Z_{\text{avg}})^2}{N}}, \quad (3.2)$$

ahol  $Z_{\text{avg}}$  az átlagos  $Z$  magasságérték,  $Z_i$  az adott pontban meghatározott  $Z$  érték, és  $N$  a pásztázott területen belüli pontok száma.

A 3.19. ábrán egy polírozott vas felület AFM-felvételét láthatjuk (bal oldali felvétel), melyre <sup>57</sup>Fe-izotópban dúsított vasréteget párologtattunk (középső kép), majd a réteg jobb tapadását elősegítendő Ar-ionokkal ionimplantálást hajtottunk végre (jobb oldali felvétel). Az érdességi adatokból kiderül, hogy a párologtatás hatására durvult a felület, míg az ionimplantálásnak simító hatása van.



3.19. ábra. Vasz felület érdességének változása különböző kezelések hatására<sup>17</sup>

Fontos megjegyezni, hogy a kicsi képméret miatt az AFM-ben meghatározott érdességparaméter értéke gyakran függ a kép méretétől, tehát összehasonlító vizsgálatokat csak azonos méretű képek felhasználásával szabad végezni. Más eljárásokkal a magasságértékek

statisztikus kiértékelésével rétegvastagságot lehet meghatározni, de különböző korrelációs és fraktál számolási eljárások is hozzátartoznak az SPM-szoftverek kiértékelő eljárásaihoz.

### 3.7. Irodalom

1. Binnig G.; Rohrer H. *Helv. Phys. Acta* **1982**, 55, 726.
2. Balázs E.; Kálmán E.; Nagy P. *Pásztázószondás mikroszkópia*, BME jegyzet, **1996**.
3. *Scanning Probe Microscopy and Spectroscopy: Theory, Techniques, and Applications*, D. Bonnell, (Ed.), Wiley-VCH: New York, **2001**.
4. Meyer E.; Hug H. J.; Bennewitz R. *Scanning Probe Microscopy – The Lab on a Tip*, Springer, **2004**.
5. Giessibl F. J. *Rev. Mod. Phys.* **2003**, 75, 949.
6. Binnig G.; Quate C. F.; Gerber Ch. *Phys. Rev. Lett.* **1986**, 56, 930.
7. Pohl D. W.; Denk W.; Lanz M. *Appl. Phys. Lett.* **1984**, 44, 651.
8. Chen C.J. *Introduction to Scanning Tunneling Microscopy*, Oxford University Press, **1993**.
9. *Scanning Tunneling Microscopy, Vol. I, II, and III*, H.-J. Günterodt, R. Wiesendanger (Eds.), Springer, **1993, 1995, 1996**.
10. *Scanning Tunneling Microscopy*, J. Stroscio, W. J. Kaiser (Eds.), Academic Press, **1993**.
11. Paszternák A.; Molnár Gy.; Szabó I.; Pető G.; Kálmán E. *High-quality Gold Substrate for Scanning Probe Microscopy Measurements*, First International Conference on Functional NanoCoatings, Budapest, 2008. május 30. – április 2.
12. Berkó A.; Solymosi F. *Langmuir* **1996**, 12, 1257.
13. R. Wiesendanger. *Scanning Probe Microscopy and Spectroscopy: Methods and Applications*, Cambridge University Press, **1998**.
14. Koós A. A.; Horváth Z. E.; Osváth Z.; Tapasztó L.; Niesz K.; Kónya Z.; Kiricsi I.; Grobert N.; Rühle M.; Biró L. *Materials Science and Engineering C* **2003**, 23, 1007.
15. Meyer G.; Amer N. M. *Appl. Phys. Lett.* **1988**, 53, 1045.
16. Paszternák A.; Pilbáth A.; Keresztes Z.; Felhősi I.; Telegdi J.; Kálmán E. *Materials Science Forum* **2008**, 589, 257.
17. Paszternák A.; Stichleitner S.; Felhősi I.; Keresztes Z.; Nagy F.; Kuzmann E.; Vértés A.; Homonnay Z.; Pető G.; Kálmán E. *Electrochimica Acta* **2007**, 53 (2), 337.



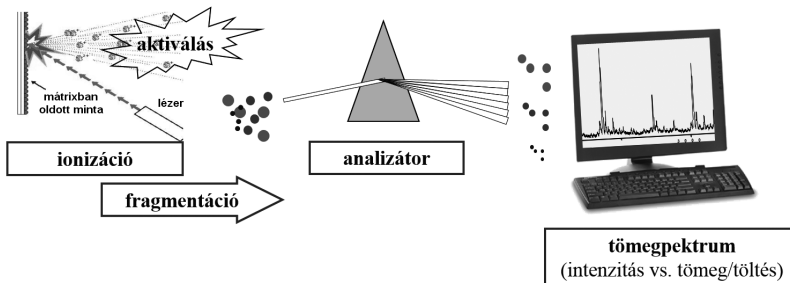
# 4. Tömegspektrometria

Vékey Károly, Drahos László, Ludányi Krisztina

## 4.1. Bevezetés

A tömegspektrometria az analitika és a szerkezetkutatás fontos, széles körben alkalmazott műszeres módszere, gyakori rövidítése az „MS” (mass spectrometry angol szóból). Egy különleges mérlegnek tekinthető, mellyel molekulák, ill. az ezeket felépítő egységek (atomok, atomcsoportok, molekularészek) tömegét lehet megmérni. A tömegspektrometria vegyületek szerkezetének jellemzésére és azonosítására, továbbá mintákban kis mennyiségben jelen levő szennyezőkomponensek minőségi és mennyiségi meghatározására alkalmas.<sup>1</sup>

A módszer alapelve, hogy a vizsgálandó mintában lévő molekulákat ionizálják; ezeket az ionokat tömeg/töltés értékük szerint szétválasztják, meghatározzák a tömeg/töltés értéküket, majd detektálják – ezt szemlélteti a 4.1. ábra. Az ionizáció az úgynevezett „ionforrásban” következik be. Az ionizáció során a vegyület gyakran gerjesztett állapotba kerül, mely kémiai reakciók sorozatát indítja el.



4.1. ábra. A tömegspektrometria sematikus bemutatása

Ennek következtében az ionizált molekula („molekulaion”) kisebb egységekre hasad: „fragmentáció” során fragmentumok képződnek. A fragmentáció jellemzi a molekula szerkezetét, így a tömegspektrometria a szerkezetkutatásban jól alkalmazható eszköz. A termékeket a készülék „analizátorában”, elektromágneses terek segítségével, különböző elvek szerint választják szét tömeg/töltés ( $m/z$ ) értékük szerint. A detektor a tömeg/töltés értékük alapján szétválasztott ionokat detektálja, az észlelt jel

intenzitása az ionok mennyiségével arányos. A tömegspektrum az ionok intenzitását tömeg/töltés értékük függvényében mutatja be.<sup>2</sup>

A tömegspektrometria az egyik legérzékenyebb szerkezetvizsgálati és analitikai módszer. Segítségével femtomol, attomol, vagy akár zeptomol ( $10^{-15}$ ,  $10^{-18}$ ,  $10^{-21}$  mol) mennyiségben rendelkezésre álló anyagok is észlelhetők; testnedvekben (pl. vérplazmában) nanogramm/mL, pikogramm/mL koncentrációban előforduló vegyületek is kimutathatók. A tömegspektrometria kromatográfiás technikákkal (a MALDI<sup>3</sup> kivételével) jól kapcsolható; a GC-MS, ill. a HPLC-MS<sup>4</sup> a legnagyobb hatékonyságú, általánosan használható analitikai módszer. A komponensek kromatográfiás elválasztását követően a tömegspektrometriával tovább növelhető a módszer szelektivitása, ill. lehetővé válik az elválasztott komponensek szerkezetazonosítása.

A módszer a szerkezetvizsgálat mellett mennyiségi (kvantitatív) vizsgálatok elvégzésére is alkalmas: a detektor a beérkező anyagmennyiséggel arányos jelintenzitást mér, amely a koncentrációval széles tartományban lineárisan változik (4-5 nagyságrendben). A speciális MS-technikák a módszer alkalmazhatóságát tovább bővítik. Ezek között kiemelkedő jelentősége van a tandem (MS/MS<sup>5</sup>) és a nagyfelbontású tömegspektrometriának. Az MS/MS technika részben jelentős mértékben növeli a tömegspektrometria szerkezetkutatásban betöltött szerepét, részben pedig javítja a módszer szelektivitását, amely az analitikai alkalmazások szempontjából kiemelkedő fontosságú. A nagyfelbontás lehetővé teszi a molekulatömeg néhány ppm pontosságú meghatározását, mely segítségével a molekulák elemi összetétele meghatározható.

A tömegspektrometriát rendkívül széles körben használják, pl. a gyógyszeriparban, környezetvédelemben, orvosi,<sup>6</sup> biokémiai kutatásokban, fehérjeanalitikában stb. Univerzális detektornak tekinthető, hiszen atomok (vagy akár elemi részecskék), szerves molekulák, makromolekulák, ill. nemkovalens erők által összetartott komplexek is vizsgálhatók. Atomok vizsgálata elsősorban ICP-MS-sel<sup>7</sup> (induktív csatolású plazma tömegspektrometria) történik, amellyel minták elemi összetétele (főleg fémtartalma) határozható meg nagy érzékenységgel. Ezt a technikát a gyógyszeripar elsősorban fémszennyezések kimutatására alkalmazza, de ennek tárgyalására a jelen összefoglalóban nincs lehetőségünk. A gyógyszeripari alkalmazások során tipikusan 2000 Da-nál kisebb molekulatömegű szerves vegyületeket vizsgálnak, ez a fejezet fő tárgyköre. Az elmúlt évtizedben nagy jelentőségre tettek szert a fehérje alapú gyógyszerek, ezért röviden ezek analitikáját is bemutatjuk.

A tömegspektrometria alkalmazási lehetőségeit nem csak a vegyületek, hanem a vizsgálandó probléma oldaláról is érdemes tárgyalni. A gyógyszeriparban, ill. gyógyszerkutatóban leggyakrabban előforduló, tömegspektrometriát igénylő tipikus feladatok a következők:<sup>8,9</sup>

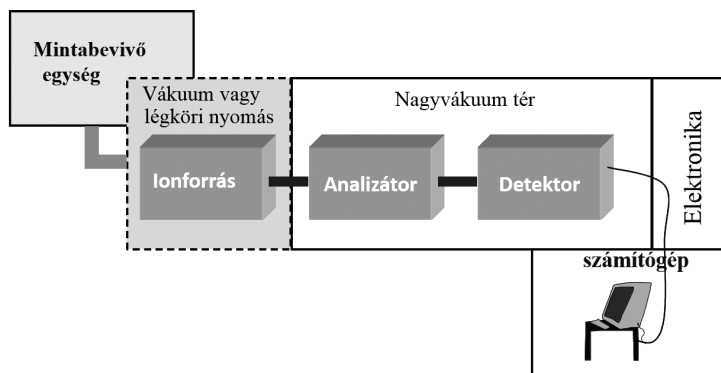
- a) *Szerves vegyületek szerkezetvizsgálata* esetén a tömegspektrumból nyerhető legfontosabb információ a molekulatömeg. Amennyiben  $\sim 1$  ppm pontosságú tömegmérés megvalósítható (ez a rendelkezésre álló tömegspektrométer típusától függ), a molekulatömegeből az elemi összetétel (összegképlet) is meghatározható. A tömegspektrum többnyire alkalmas vegyületek szerkezetének azonosítására, ill. ellenőrzésére, fontosabb szerkezeti elemek, funkciós csoportok meghatározására. A tömegspektrum azonban tipikusan nem nyújt elegendő információt egy ismeretlen vegyület teljes szerkezetfelfedezésére, izomerek megkülönböztetésére.
- b) *Szennyezések, szennyezésprofil vizsgálata*, minőségbiztosítás. A tömegspektrometria – nagy érzékenységének és kromatográfiai technikákhoz csatolásának köszönhetően – kiválóan alkalmas nyomnyi mennyiségben előforduló szennyezések kimutatására, azonosítására. Gyógyszerkészítmények esetén elvárt a 0,05%-ban jelen levő szennyezők, bomlástermékek azonosítása, mennyiségi meghatározása. Egyes esetekben (pl. oldószermaradványok esetén) ennél jóval kisebb koncentrációjú komponensek kimutatása is szükséges és lehetséges tömegspektrometriával.
- c) *Kvantitatív analízis* a tömegspektrometria gyakori feladatai közé tartozik. Ennek két tipikus esete a farmakokinetika (gyógyszerszintek, ill. gyógyszerek metabolizmusának időbeli követése) és egyes betegekben mért gyógyszerszintek ellenőrzése (terápiás célú gyógyszerszint-meghatározás).
- d) *Metabolizmusvizsgálat*. Biológiai mátrixban (pl. vérben, vizeletben, agyban, székletben stb.) kis koncentrációban jelen lévő, egy adott gyógyszermolekula biológiai lebomlásából származó termékek kimutatása, szerkezetmeghatározása, és ezek koncentrációjának mérése.
- e) A tömegspektrometriát gyakran nem várt feladatok, problémák megoldására használják. Ezek gyakran a legnehezebb, de egyúttal legérdekesebb feladatok. Ilyen jellegű vizsgálatoknál a tömegspektrometria nagy érzékenysége (kis anyagmennyiség elegendő), nagy szelektivitása (a minta komplex összetétele, a „mátrixhatás” nem vagy csak kis mértékben zavaró) és specifikus

jellege (a spektrum jól jellemzi a célvegyületet) meghatározó jelentőségű.

## 4.2. A tömegspektrometria alapfogalmai, legfontosabb módszerei

### 4.2.1. Alapfogalmak, legfontosabb jellemzők

A tömegspektrometriás vizsgálat során a mintát egy ún. mintabevivő rendszeren keresztül az ionforrásba juttatják. A mintabevivő egység lehet direkt adagolásra alkalmas (ez esetben a minta egy zsilipkamrán keresztül közvetlenül jut az ionforrásba), vagy gáz-, ill. folyadékkromatográfiás rendszer (mely esetben a kromatográfól eluálódó vegyületek „on-line” jutnak a tömegspektrométer ionforrásába). Az ionforrás feladata a töltéssel rendelkező részecskék előállítás, amelyek tömeg/töltés szerinti elválasztása az analizátorban történik. Az ionokat a detektor észleli. Az adatfeldolgozó rendszer a detektorba érkező ionok mennyiségét  $m/z$  értékük függvényében rögzíti, a mérés eredménye a tömegspektrum. A tömegspektrométerben az analizátor és detektor mindig nagyvákuumban helyezkedik el, az ionforrás a technikai megvalósítástól függően légköri nyomáson vagy vákuumban üzemel. A készülékeket vezérlő elektronika, ill. számítógépes adatfeldolgozó rendszer egészíti ki. A tömegspektrométer elvi felépítését a 4.2. ábrán szemléltetjük; egy működésben, ill. szétnyitott állapotban lévő tömegspektrométer fényképe a 4.3. ábrán látható.



4.2. ábra. A tömegspektrométer elvi felépítése

A mérés eredménye a *tömegspektrum*, amelyen a tömeg/töltés ( $m/z$ ) értékek függvényében adják meg a mintából képződő ionok intenzitását. Egy ilyen tömegspektrum látható a 4.4. ábrán.

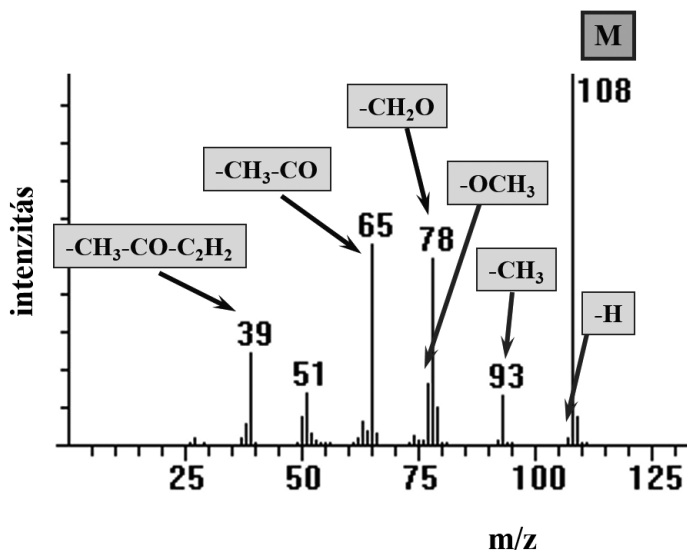


4.3. ábra. Tömegspektrométer képe működés közben, ill. szétszerelt állapotban

A spektrumban észlelt ionok több lépésben képződnek. A minta ionizációja révén képződik a molekulaion ( $M^+$ ), amely – az ionizáció típusától függően (4.2.2. fejezet) – egy elektron leszakadásával (elektron-ütközéses ionizáció), vagy egy kation (pl. proton) hozzáadásával történhet. Ez utóbbi esetben a keletkezett iont „protonált molekulaionnak” ( $MH^+$  vagy  $[M+H]^+$ ), a köznapi szóhasználattal „kvázi-molekulaionnak” nevezik. Itt szeretnénk megjegyezni, hogy hasonló folyamatok segítségével negatív töltésű ionok is előállíthatók. A molekulaion képződése során tipikusan gerjesztett állapotba kerül. A gerjesztés mértéke általában igen jelentős, akár 3-5 eV értéket is elérhet. A gerjesztés gyors kémiai folyamatokat indukál, amelyet fragmentációnak neveznek. A *fragmentáció* párhuzamos és egymást követő reakciók sorozata, melynek eredményeként fragmensionok keletkeznek ( $F^+$ ). A fragmentáció (mint bármely más kémiai reakció) a vegyület szerkezetétől függ, ennek megfelelően jellemzi a szerkezetet, és alkalmas annak bizonyos mértékű (teljes vagy részleges) meghatározására. A spektrum és a fragmentáció a kísérleti körülményektől is jelentős mértékben függ. Ezért a tömegspektrometria esetén is rendkívül fontos, hogy a kísérletek, mérési körülmények megfelelő módon legyenek tervezve, ill. optimalva.

A tömegspektrometriás *fragmentáció értelmezése* empirikus szabályok alapján történik. Ezek egyes vegyületekre, vegyületsoportokra jól ismertek. A fragmentációs szabályok, ill. a spektrumértelmezés tárgyalása meghaladja a jelen fejezet kereteit, az érdeklődőknek McLafferty (1993), valamint Dinya Z. (2001) könyvét javasoljuk, mely ezt a kérdéskört

részletesen ismerteti. A spektrumértelmezést spektrumkönyvtárak, számítógépes programok segítik, ezeket a tömegspektrométert vezérlő és felhasználó szoftvercsomagok gyakran tartalmazzák.

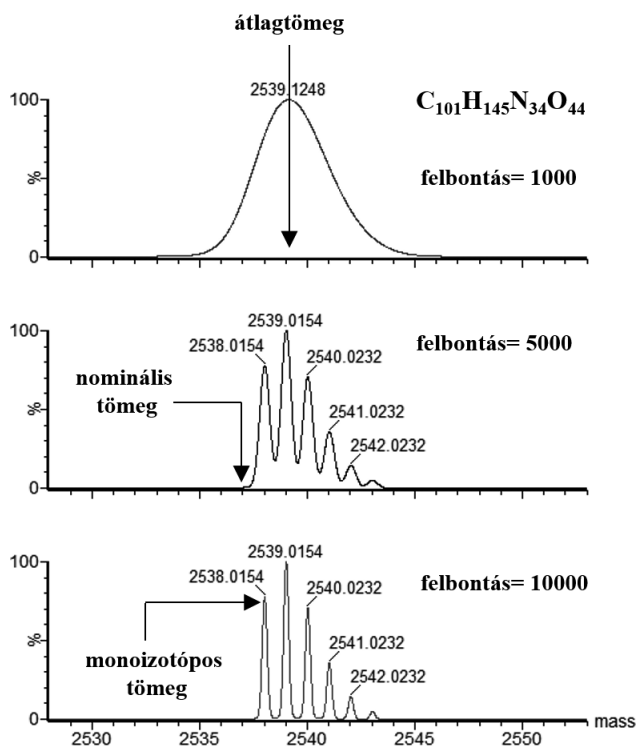


4.4. ábra. A fenil-metil-éter elektronütközéses tömegspektruma a fontosabb fragmensionok jelölésével

A természetes *stabil izotópok jelenlétének* fontos szerepe van a tömegspektrometriában. Egy atom különböző izotópjait (pl.  $^{12}\text{C}$ ,  $^{13}\text{C}$ ) különböző tömeg/töltés érték jellemzi, és ezek a tömegspektrumban külön-külön láthatók. Ez természetesen molekulák esetén is így van. A 4.4. ábrán pl. a 108-as molekulatömegű vegyület izotópcsúcsai láthatók m/z 109, 110 és 111 Da-nál, amelyek különböző számú  $^{13}\text{C}$ -,  $^{18}\text{O}$ - és  $^2\text{H}$ -izotóptól származnak. A 4.5. ábra egy nagyobb molekulatömegű vegyület izotópcsúcsait (izotópeloszlását) mutatja. Az atomi és molekulatömeg kiszámításához a *tömegdefektust* (az atommagokat összetartó kötési energiának megfelelő tömeg) szintén figyelembe kell venni. Ennek következtében az egyes izotópok tömege az egységnyitől eltérő, pl.  $^1\text{H} = 1,0078$ ,  $^{16}\text{O} = 15,9949$ .<sup>10</sup>

A stabil izotópok jelenléte és a tömegdefektus miatt a molekulatömeg különböző módon definiálható. Ha az atomi tömegeket egész számra kerekítik, az így számított érték adja a *nominális tömeget*. Abban az esetben, ha az egyes izotópok tömegét pontosan (általában 4 tizedesjegyre) számítják ki, a *pontos tömeg* határozható meg. A pontos tömeg az egyes izotópcsúcsokra külön-külön számítható, a molekulatömeget általában

az egyes elemek legintenzívebb (legnagyobb előfordulási gyakoriságú) izotópjának figyelembevételével adják meg. Különösen nagy molekulatömegek esetén használják az *átlagtömeg* kifejezést – ez a kémiai atomsúlyokból számolt tömeg, mely mind a természetes izotópeloszlást, mind pedig az egyes izotópok pontos tömegét figyelembe veszi. Ennek egyik jellegzetes példája a klór, amelynek (kémiai) atomsúlya 35,5 Da, a  $^{35}\text{Cl}$ - és  $^{37}\text{Cl}$ -izotópok tömegének előfordulásukkal súlyozott átlaga. Gyakorlati szempontból kisebb molekulatömegű ( $M < 500$ ) szerves vegyületek esetén tipikusan a nominális tömeget, nagyfelbontású tömegspektrométerek esetén a pontos tömeget használják. Ebben az esetben a pontos tömeg egész számra kerekítve a nominális tömeget adja. Az átlagtömeggel legtöbbször nagy ( $> 3000$  Da) molekulatömegű vegyületek esetén számolnak. Kérdéses esetben mindig meg kell adni, melyik tömegdefiniációt használták.<sup>11</sup>



4.5. ábra. Molekulatömeg-meghatározás a tömegspektrum felbontásának függvényében, ill. különböző felbontású tömegspektrumokban alkalmazott molekulatömeg-definíciók



A tömegspektrometriás kísérlet fontos jellemzője a felbontás ( $R$ ). A felbontás két egymás mellett levő csúcs egymástól történő elválasztását jellemzi. Leggyakoribb definíciója  $R=M/\Delta M$ , ahol  $M$  az adott csúcs tömege,  $\Delta M$  pedig szélessége a maximális intenzitás 50%-os magasságánál. A legtöbb kereskedelemben kapható készülék 1000-2000 Da tömegig „egységnyi” felbontással rendelkezik, amely azt jelenti, hogy az izotóp csúcsok egymástól elkülönülve észlelhetők. Nagyfelbontású készülékről általában akkor beszélnek, ha a felbontás legalább 10000. A nagyfelbontású tömegspektrométerek legnagyobb előnye, hogy legalább 10 ppm pontos tömegmérésre alkalmasak. A tömegspektrométer másik fontos jellemzője a tömegtartomány (pontosabban  $m/z$  tartomány), amely a tömeganalizátor jellemzője.

A pontos tömegmérés lehetővé teszi az elemi összetétel (összegképlet) meghatározását, amely rendkívül fontos szerkezeti információ. A régebben szokásos elemanalízist helyettesíti, ennek hiányában vegyületek szerkezete nem tekinthető igazoltnak. A pontos tömegmérés legfontosabb jellemzője annak pontossága. 10 ppm pontos tömegmérés esetén  $\sim 300$  Da; 1 ppm pontosság esetén  $\sim 500$  Da molekulatömegig lehet meghatározni az elemi összetételt. A vegyületek szerkezetéről további információt nyújtanak az izotópcsúcsok. Ennek három legfontosabb alkalmazása a következő: (a) jellegzetes izotópeloszlással rendelkező atomok (pl. Cl, Br, részben S, Si, valamint számos fématom) jelenléte és száma is valószínűsíthető; (b) az első izotópcsúcs intenzitása (melyet főleg a  $^{13}\text{C}$ -izotóptartalom határoz meg) alapján a molekulában előforduló szénatomok száma megbecsülhető (a  $^{13}\text{C}$  természetes előfordulási valószínűsége  $\sim 1,1\%$ , így az első izotópcsúcs %-ban kifejezett intenzitását 1,1-gyel osztva közelítőleg megkapjuk a szénatomok számát); (c) a gyógyszerkutatásban gyakori stabil izotópok alkalmazása. Stabil izotóppal jelzett referensanyagok az eredeti vegyülettől (az izotóptartalomtól függően) néhány tömegszám távolságban adnak jelet; a jelzett és a jelzetlen vegyület intenzitásaránya ezek mennyiségi arányát jól jelzi, kvantitatív vizsgálatok esetén kulcsfontosságú szerepet játszik. Itt jegyezzük meg, hogy kvantitatív mérések esetén a jellemző paraméterek meghatározása (érzékenység, kimutatási határ, stb.) hasonló módon történik, mint a kromatográfias vizsgálatok esetén.

### 4.2.2. Ionizációs módszerek

A ma már hagyományosnak tekinthető és csak viszonylag illékony komponensek vizsgálatára alkalmas elektronütközéses (EI)<sup>1b,1c</sup> és kémiai



(CI)<sup>1b,1c</sup> ionizáció mellett új, „kíméletesebb” ionizációs módszerek jelentek meg (pl.: MALDI,<sup>12</sup> APCI, ESI,<sup>12</sup> APPI<sup>1e</sup> stb.), amelyek a tömegspektrometria alkalmazhatóságát poláris, nagy molekulatömegű és bomlékony anyagokra is kiterjesztették. Az ionizációs módszer megválasztását a vizsgált vegyület polaritása és molekulatömege határozza meg. Az EI/CI-t és APPI-t elsősorban kis moláris tömegű, apoláris vegyületek (pl. szénhidrogének, aromás vegyületek, flavonoidok, szteroidok, stb.), az elektroporlasztásos ionizációt (Electrospray, ESI), atmoszférikus nyomású kémiai ionizációt (APCI) és a mátrixszal segített lézer deszorpciós ionizációt (MALDI) nagyobb moláris tömegű, polárisabb vegyületek, pl. peptidek, proteinek, nukleotidok vizsgálatára használják. A gyógyszerkutatásban leggyakrabban ESI- és EI-ionizációt alkalmaznak.

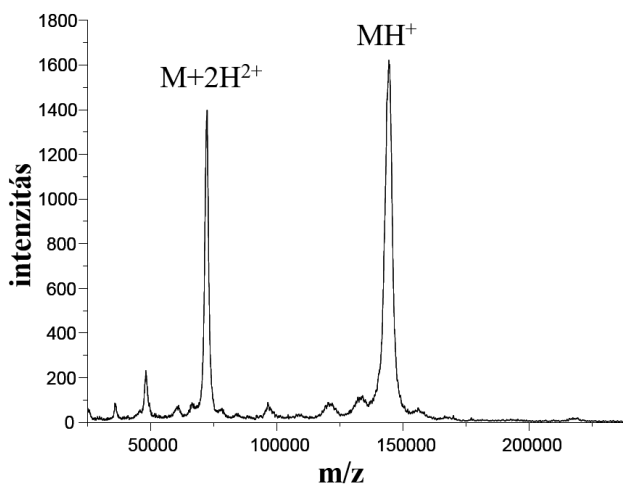
Elektronütközéses ionizációval (electron ionization, EI) viszonylag illékony, kisebb molekulatömegű (50-1000 Da), nemionos szerkezetű vegyületek ionizálhatók. Az ionforrás nagyvákuum-térben helyezkedik el, és 200 °C körüli hőmérsékleten üzemel. Az ionizáció ún. katóddal előállított elektronnyalábbal történik, amelynek hatására elektronlehasadással képződik a pozitív töltésű molekulaion ( $M^+$ ,  $M^+$ ), mely egy párosítatlan elektront tartalmaz (gyökion). Ebből (a gerjesztés mértékének és a vegyület szerkezetének függvényében) fragmens ionok keletkezhetnek. A reaktivitást jelentős mértékben a párosítatlan elektron (ill. az ennek megfelelő molekulapálya) elhelyezkedése irányítja. Ezt a félig betöltött molekulapálya jelzi, mely gyakran (jó közelítéssel) egy adott atomra lokalizálódik. A módszer előnye, hogy minőségi és mennyiségi analízisre is alkalmas, a szerkezeti vizsgálatokhoz spektrumkönyvtári azonosítás áll rendelkezésre (pl. NIST-adatbázis), ill. elemi összetétel is meghatározható nagyfelbontású készülékek segítségével. Az EI hátránya, hogy számos vegyület esetén a molekulaion könnyen bomlik (termikus bomlás), így nem, vagy csak kis intenzitással észlelhető, amely a szerkezetvizsgálatot nagymértékben megnehezíti.

A kémiai ionizáció (chemical ionization, CI) segítségével a molekula-tömeg könnyen és egyértelműen meghatározható, még abban az esetben is, ha EI esetén molekulaion nem észlelhető a spektrumban. A kémiai ionforrás technikai kialakítása hasonlít az EI-forráshoz, de az ionforrásba viszonylag nagy (0,1-1 torr) nyomású gázt, úgynevezett reagensgázt (pl. metán, izobután vagy ammónia) juttatnak. A minta ionizációja ebben a gázból létrejött plazmában történik ion-molekula ütközések révén. Ennek következtében a vegyület protonálódik, a spektrumban protonált molekulaion ( $MH^+$ ,  $[M+1]^+$ ) látható. Ez (az EI-ionizáció során képződő molekulaionnal szemben) zárt elektronshéjjal rendelkezik. A legtöbb

esetben ez a spektrumban észlelt legintenzívebb ion, így a molekulatömeg meghatározása egyértelmű. A kémiai ionizációs spektrum értelmezését gyakran nehezíti, hogy protonálódáson kívül adduktok is keletkeznek (pl.  $[M+NH_4]^+$ ). Az ionizáció negatív üzemmódban is megvalósítható, így negatív töltésű (pl.  $[M-H]^-$ ) ionok képződnek. Mind az EI-, mind pedig a CI-technika „on-line” kapcsolható gázkromatográfiával, amit a későbbiekben részletesen tárgyalunk.

A mátrixszal segített lézereszorpciós ionizáció (matrix-assisted laser desorption/ionization, MALDI) nagy molekulatömegű vegyületek, pl. peptidek, proteinek, glikoproteinek vizsgálatára alkalmas ionizációs technika (4.6. ábra). A minta bevitele kristályok formájában történik úgy, hogy a mintát egy ún. mátrixmolekulá-val együtt kristályosítják, majd a kristályokat lézersugárral besugározzák. A lézerfényt a mátrix nyeli el, ennek következménye a minta ionizációja.

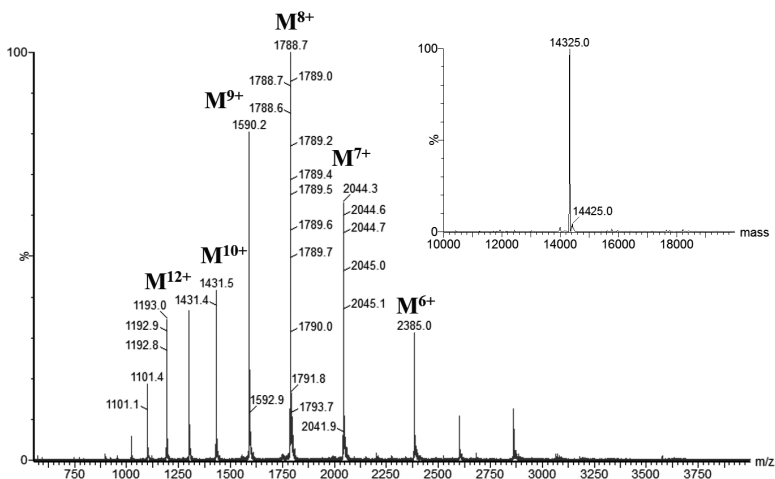
A módszer igen érzékeny, akár  $10^{-15}$ – $10^{-21}$  mol mennyiségű minta vizsgálatára is alkalmas. Pozitív és negatív üzemmódban is használható, főként egyszeres, esetleg kétszeres töltésű ionok keletkeznek, amelyek tipikusan protonált molekulák vagy alkálifém addukcionok ( $[M+H]^+$ ,  $[M+Na]^+$ ). A módszer előnye, hogy akár többszázezer Da tömegű molekulák vizsgálatára is alkalmas, a sószennyezéseket (néhány mmol koncentrációban) jobban tolerálja, mint más ionizációs technikák, és keverékek direkt analízisére is használható. Hátránya, hogy mennyiségi meghatározásra csak korlátozottan alkalmas és on-line elválasztástechnikai módszerekhez nem kapcsolható.



4.6. ábra. Nagy molekulatömegű (intakt) immunoglobulin fehérje MALDI-spektruma

Az elektroporlasztásos (electrospray) ionizáció (ES, ESI) az egyik leggyakoribb ionizációs technika, poláris, ionos, kis és nagy tömegű molekulák vizsgálatára egyaránt alkalmas. A mintaoldat egy kapillárison keresztül jut az ionforrásba, ahol nagyfeszültség, porlasztó gáz és fűtés segítségével többszörösen töltött aeroszol cseppek keletkeznek. Ezek mérete részben párolgás, részben porlasztás révén csökken, és amikor elérnek egy kritikus méretet, a töltéstartás hatására „szétrobbannak” (Coulomb-robbanás). Az ionevaporációs modell szerint egy sokszorosán töltött aeroszol cseppből a töltéstartás következtében ionok lépnek ki. Amennyiben a cseppből az összes oldószer elpárolgása révén keletkeznek a többszörösen töltött ionok, „charge residue” modellről beszélnek. Mindkét folyamat során többszörösen töltött molekulaionok képződnek, amelyek leggyakrabban többször protonált, esetenként több fémiont tartalmazó molekulák ( $[M+nH]^{n+}$ ,  $[M+nNa]^{n+}$ ). A töltések száma a molekulamérettől függ, tipikusan 1000 Da tömegegységre jut egy töltés. Nagyobb molekulák esetén tipikus a széles töltéeloszlás. Ennek megfelelően egy 100 kDa tömegű protein esetén általában 50-szer, 100-szor, 200-szor töltött ionok is detektálhatók. ES-ionizáció negatív üzemmódban is használható, ebben az esetben leggyakrabban  $[M-nH]^{-}$  ionok láthatók.

Az elektroporlasztásos ionizációt széles körben alkalmazzák, rendkívül érzékeny módszer ( $\sim 10^{-12}$ – $10^{-18}$  mol). Előnye, hogy on-line kapcsolható folyadékromatográfiával, minőségi és mennyiségi analízisre egyaránt használható. A kromatográfiás rendszer csak illékony puffert tartalmazhat (pl. ammónium-formiát, ammónium-acetát), mivel szerves sók pufferként való alkalmazását az ESI csak kevésbé tolerálja. A gyógyszerkutatásban gyakori szerves molekulák mellett nagy molekulatömegű proteinek, glikoproteinek, oligonukleotidok, polimerek szerkezeti meghatározására is alkalmas. Az ESI során többszörösen töltött ionok keletkeznek, ezért a molekulatömeg meghatározásához a töltésállapot ismerete elengedhetetlen. Nagyfelbontású tömegspektrométer és  $\sim 10$  kDa-nál kisebb molekulatömeg esetén a molekulák izotópcsúcsai jól elválnak egymástól. Ezek távolságának ismeretében az ion töltése egyértelműen meghatározható (pl. 3-szor töltött ion esetén az izotópcsúcsok 1/3 tömeg/töltés távolságban vannak egymástól). A töltésállapot meghatározásának másik lehetősége a spektrumban észlelt, különböző számú töltéssel rendelkező ionsorozat tömeg/töltés értékeinek felhasználása. Két szomszédos csúcs között a töltésszám 1-gyel változik; ennek alapján kétismeretlenes egyenlet megoldásával vagy számítógépes program segítségével a molekulatömeg meghatározható. A 4.7. ábrán egy kisebb fehérje (a lizozim) ESI-spektruma látható.



4.7. ábra. Lizozim fehérje ESI-spektruma. A jobb felső sarokban az egyszeres töltésre konvertált spektrum látható.

Az ES-ionizációhoz technikai szempontból nagyon hasonló az atmoszférikus nyomású kémiai ionizáció (APCI, atmospheric pressure chemical ionization) és az atmoszférikus nyomású fotoionizáció (APPI, atmospheric pressure photo ionization). Az APCI kis vagy közepesen poláris (< 2000 Da) molekulák vizsgálatára alkalmas. Az APCI-ionforrás kialakítása az ES-ionforráshoz hasonló, de ebben az esetben a porlasztás és az ionizáció térben és időben is elkülönülve történik. Az aeroszol cseppek előállítása, majd ezek elpárologtatása fűtött kapillárisban történik; az ionizáció pedig az oldószer elpárologtatása után kialakuló gázban koronakisülés hatására történik. APCI-körülmények között egyszerűen töltött „kvázi molekulaionok” (tipikusan protonált molekulák) keletkeznek. A technika hátránya, hogy hőérzékeny vegyületek termikus bomlást szenvedhetnek. Apoláris vegyületek meghatározására az APPI-módszer alkalmas. Ez technikailag leginkább az APCI-hoz hasonló, de az ionizáció fotonokkal történő ütközések hatására következik be. Ennek során egyszeres töltésű gyökionok (M<sup>+</sup>) és/vagy protonált molekulák (MH<sup>+</sup>) képződnek. Ez a módszer azonban nem tekinthető rutinteknikának.

Az ionizációs módszerek közül az EI-ionizációt ún. „kemény” ionizációs technikának tekintik, mert az ionforrásban tipikusan jelentős mértékű fragmentáció következik be. A fent említett egyéb ionizációs módszerek ún. „lágy” (soft) ionizációs technikák, amelyek tipikusan intenzív („kvázi”) molekulaiont szolgáltatnak. Az ESI-, APCI-, APPI- módszerek közös tulajdonsága, hogy az ionforrásban a kísérleti körülmények (elsősorban az

ún. „cone-orifice voltage”) változtatásával jelentős mértékű fragmentáció is elérhető, így a molekuláról szerkezeti információ nyerhető.

Az előzőekben bemutatott ionizációs módszerek mellett más ionforrások is beszerezhetők. Ezek közül érdemes megemlíteni az utóbbi évtizedben kifejlesztett „ambient” ionizációs technikákat, amelyek közös tulajdonsága, hogy az ionizáció a tömegspektrométeren kívül történik, így felületek analizésére alkalmasak. Ilyen pl. a kereskedelmi forgalomban is kapható DESI-, LAESI-, ill. DART-technika.

### 4.2.3. Tömeganalizátorok

A tömegspektrometriás vizsgálat ionizációt (és az esetleges fragmentációt) követő lépése az ionok tömeg/töltés szerinti elválasztása, amely az analizátorban történik. Ez a tömegspektrométer meghatározó egysége, a tömegspektrométerek elnevezése is ezt követi. A tömeg/töltés meghatározásának számos különböző elve ismert, ezek mindegyike elektromágneses terek alkalmazásán és az ionok mozgásának tehetetlenségén alapul. Sok esetben a tömegspektrométerben egymást követően két vagy több analizátort helyeznek el, amely tandem tömegspektrometriás vizsgálatok elvégzését teszi lehetővé. A jelenleg legszélesebb körben használt analizátorokat (és egyúttal készüléktípusokat) az alábbiakban tárgyaljuk.

A kvadrupól analizátor (Q) négy, szimmetrikus elhelyezkedésű, kör- vagy hiperbolikus keresztmetszetű rúdból áll, amelyek közül az egymással szemben elhelyezkedő rudakra azonos, míg az egymás mellett lévőkre ellentétes polaritású, nagyfrekvenciájú váltóáramot (feszültséget) kapcsolnak. Az így kialakuló kvadrupóláris térben az ionok oszcilláló mozgásra kényszerülnek és végighaladnak a rudak között. Az oszcilláló mozgást végző ionok közül csak a kiválasztott  $m/z$  értékű ion jut át az analizátoron, a többi a kvadrupól rudaknak vagy a készülék falának ütközik, és a vizsgálat számára elveszik. A kvadrupól analizátorok tömeg/töltés tartománya tipikusan 2000-3000, esetenként 8000 Da/z értékig terjed; általában egységnyi felbontásra alkalmasak. A kvadrupól típusú tömegspektrométerek viszonylag olcsók. Nagy előnyük, hogy rendkívül robusztusak (alkalmazásuk során az elszennyeződés, a túl nagy vagy túl kis mintamennyiség, a készülék nem ideális beállítása vagy elállítása csak kevés problémát okoz) és kvantitatív vizsgálatokra ezek a legalkalmasabb készülékek.

Az ionsapda analizátorban (IT) az ionok egy cellában tartózkodnak, a tömeganalízis nem térben (mint például a kvadrupól analizátoron való áthaladás révén), hanem időben elkülönülve történik. Az ionsapda egy gyűrűelektródból és két lezáró elektródból („sapkából”) áll, elvileg egy végtelenített kvadrupól analizátornak is tekinthető. Az ionsapdában a tömeganalízis a gyűrűelektródra kapcsolt nagyfrekvenciás váltóáram hatására következik be, ezt követően az ionok  $m/z$  értékük szerint szétválasztva lépnek a detektorba. Az ionsapda analizátor tömeg/töltés tartománya tipikusan 2000 Da/z értékig terjed, pontos tömegmérésre nem alkalmas. Az ionsapdás készülékek rendkívül érzékenyek, és ezekben egymást követően több MS/MS kísérlet is elvégezhető ( $MS^n$ ). Ennek megfelelően ezt a tömegspektrométer típust elsősorban szerkezetvizsgálatra és proteomikai feladatokra használják. Mennyiségi analízisre kevésbé alkalmas (linearitási tartománya viszonylag szűk, 1-2 nagyságrend), és egyúttal kevésbé robusztus készüléktípus.

A szintén széles körben használt analizátortípus a repülési idő analizátor (TOF). Ebben az esetben az ionokat elektrosztatikus térben több (akár 10-20) kV feszültségre gyorsítják, majd mérik a detektorba jutásig eltelt időtartamot. A repülési időből az ionok tömeg/töltés értéke egyszerűen meghatározható. A TOF-analizátorok legnagyobb előnye, hogy nagyfelbontásra (20000-80000) és pontos tömegmérésre (1-5 ppm) alkalmasak. Ezen túlmenően a TOF-analizátoroknak igen jó az érzékenysége, mivel a spektrumfelvétel nem pásztázással történik mint a Q és IT esetén, hanem az összes ion észlelhető. Ennek az analizátortípusnak gyakorlatilag nincs felső tömeghatára (akár több száz kDa tömegű makromolekulák is vizsgálhatók). Az analizátorok jellemzője a szakaszos működés (egy ionsomagot gyorsítanak, megvárják, amíg az elér a detektorig, majd ezt követően indítják a következő ionsomagot). Az impulzusszerű működés MALDI-vizsgálatoknál előnyös (mivel ez is ionsomagokkal dolgozik), de folyamatos ionnyalábbal (pl. EI, ESI, MS/MS) is kombinálható.

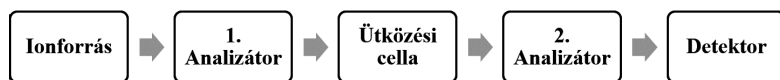
Az analizátorokat gyakran kombinálják egymással, főként tandem MS-vizsgálatok megvalósítására. Ezek közül a legelterjedtebb készülékek a hármas kvadrupól (QQQ) rendszerek, amelyek robusztusak és MS/MS vizsgálatokra alkalmasak. Ez speciális MS/MS vizsgálatok esetén a vegyületek kimutatásának és kvantitatív mérésének egyik legérzékenyebb módszere. A QTOF készüléktípus a kvadrupól analizátor robusztusságát ötvözi a TOF-analizátor nagy felbontásával, nagy tömegtartományával és pontos tömegmérési lehetőséggel, MS/MS spektrumfelvétel esetén a QQQ-készülékhez viszonyítva jelentős érzékenység növekedés is észlelhető.

A fent említett készülék- (ill. analizátor-) típusokon kívül meg kell említeni a Fourier- transzformációs (FT-MS, FT-ICR – „ion cyclotron resonance”), valamint az Orbitrap-típusú tömegspektrométereket is. Ezen készüléktípusok tipikusan ioncsapda analizátorral kombináltan működnek, legfőbb jellemzőik a nagy érzékenység, kiemelkedően nagy (akár 1000000) felbontás és rendkívül pontos (0,1 ppm) tömegmérés. Hátrányuk, hogy nagyon drágák.

A detektorok feladata az analizátorból kilépő ionok nagy érzékenységgel történő észlelése, amelyekre leggyakrabban ún. elektronsokszorozót alkalmaznak. Az elektronsokszorozó detektorok dinódákból állnak, amelyekből a becsapódó ionok elektronokat ütnek ki. Napjainkban ún. csatorna-elektronsokszorozókat használnak („Channeltron”), amelyek nagy felületű diódasoros detektorok analógja.<sup>13</sup>

#### 4.2.4. Tandem tömegspektrometria (MS/MS)

A hagyományos tömegspektrometriai vizsgálatok mellett speciális méréstechnikai módszerekkel tandem tömegspektrometriás<sup>2a</sup> vizsgálatok is végezhetők. Ezek a módszerek a vizsgált vegyületről a korábrinál sokkal részletesebb szerkezeti információt szolgáltatnak, valamint nagymértékben növelik a vizsgálat szelektivitását, ami segíti a sok komponensű minták vizsgálatát. Ez esetben a tömegspektrométer nem egy, hanem két tömeganalizátort tartalmaz, melyek között egy ütközési cella helyezkedik el. Az MS/MS vizsgálatok során az ionizációt követően az analizátorral kiválasztják a vizsgálandó iont, majd ezt az iont gerjesztik, ami újabb reakciósorozatot indít el. Az így nyert fragmenseket a második analizátorban  $m/z$  értékük szerint szétválasztják és detektálják. Az MS/MS technikával így a spektrumban észlelhető összes ionról újabb tömegspektrum készíthető, amely az egyszerű tömegspektrumhoz képest jelentős többletinformációt szolgáltat, ami a szerkezet pontosabb meghatározását teszi lehetővé. A tandem tömegspektrométer sematikus felépítése a 4.8. ábrán látható.



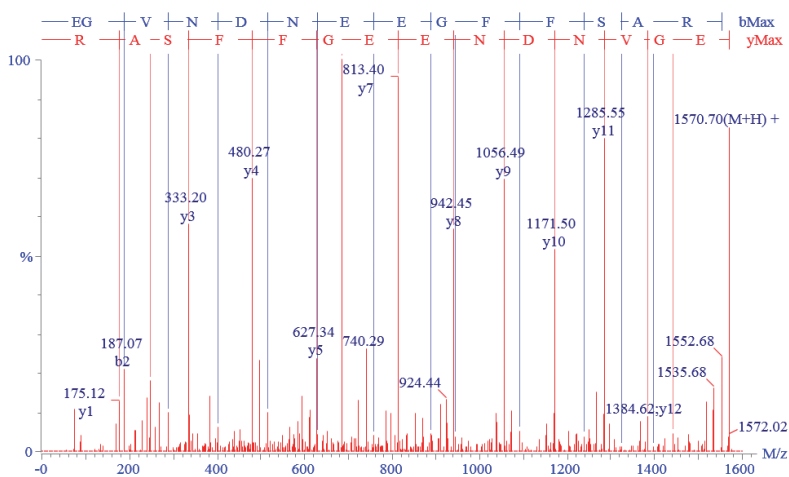
4.8. ábra. Tandem tömegspektrométer sematikus ábrája

Az MS/MS fragmentációt másodlagos gerjesztéssel biztosítják. (Az elsődleges gerjesztés az ionforrásban következik be.) A gerjesztés



legegyszerűbb és legelterjedtebb módja a gázmolekulákkal történő ütköztetés („collision induced dissociation”, CID). Ebben az esetben a gyorsan mozgó (nagy kinetikus energiával rendelkező) ionok gázmolekulákkal (pl. nitrogénnel) ütköznek, amely során a kinetikus energia egy része az ion belső energiájává alakul át. Az ütközési kamra a két analizátor között helyezkedik el, amibe viszonylag nagy (0,1-1 torr) nyomású gázt vezetnek. Ionok másodlagos gerjesztésére a CID-n kívül más megoldások is léteznek, mint pl. a fotonokkal, elektronokkal vagy felülettel való ütköztetés, de ez utóbbiakat ritkábban alkalmazzák.<sup>14</sup>

A tandem tömegspektrometriás vizsgálatok különböző mérési (pásztázási) módokkal valósíthatók meg. A leggyakrabban ún. leányion-analízist használnak („product ion scan”), melynek során az első analizátorral kiválasztják a vizsgálandó iont. A gerjesztés hatására ez fragmentálódik, a keletkezett fragmensionok meghatározása a második analizátorban történik. Ezt a mérési módot leggyakrabban metabolitok szerkezetazonosítására, fehérjék, biológiailag aktív molekulák szekvenciájának meghatározására használják. Egy peptid leányion MS/MS spektrumát mutatja be a 4.9. ábra. A spektrumban észlelt ionok (ionsorozatok) az egyes peptidkötések hasadásával képződnek, a spektrumban észlelt tömegkülönbségek jól mutatják az aminosavak sorrendjét. Peptidszekvencia meghatározására ma már ez a leggyakrabban használt módszer.



4.9. ábra. EGVNDNEEGFFSAR szekvenciájú peptid tandem tömegspektruma

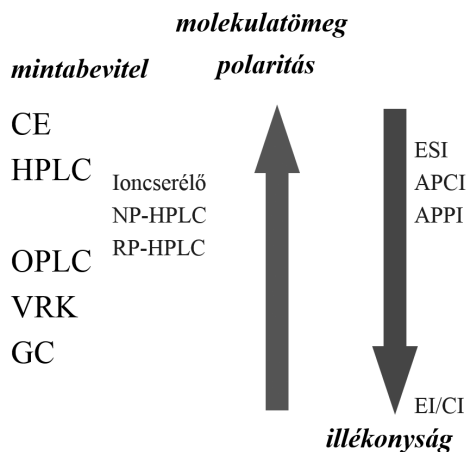


Az ún. „multiple reaction monitoring” (MRM, fragmentációs folyamatok monitorozása) egy másik, gyakran használt pásztázás. Ez a mérési mód főként ismert vegyületek sok komponensű mintákból történő kimutatására, mennyiségi meghatározásra szolgál. A vizsgálat során (külön kísérletben) először meghatározzák a vizsgálandó vegyület MS/MS spektrumát (leányion-analízis), ebből kiválasztják a legjellemzőbb (általában legintenzívebb) fragmentációs utat. Ezt a reakciót azonosítják az MRM-kísérletben az anyaion-leányion tömegének együttes pásztázásával. Tipikusan egy kísérletben számos ilyen folyamat kimutatása történik (ezért nevezik „multiple”-nek). Az MRM-pásztázás QQQ-típusú tömegspektrométeren valósítható meg, ez a vegyületek kimutatásának egyik legszelektívebb és legérzékenyebb módja. QQQ-készülékeken az MS/MS vizsgálatnak még két, viszonylag ritkán használt lehetősége is van. Az anyaion-analízis („precursor ion scan”) során azt határozzák meg, hogy egy adott tömegű, adott vegyületcsaládra jellemző fragmentum mely molekulákból képződhet. A semleges részecske vesztes monitorozásakor („constant neutral loss”) egy olyan fragmentációtípust keresnek, mely adott semleges molekula kilépésével (pl. vízvesztéssel) történik, és mely jellemző a vegyületcsaládra. Ez utóbbi módszereknek leginkább a metabolitkutatásban van jelentőségük, amikor a nagy mennyiségű zavaró jel mellett kell meghatározni adott molekulacsaláddhoz tartozó komponenseket.

#### 4.2.5. Kapcsolt technikák

A tömegspektrometria nagy hatékonyságú elválasztástechnikai módszerekkel történő kapcsolása az utóbbi két évtizedben rendkívül nagy jelentőségre tett szert. Ennek legfontosabb oka, hogy a két módszer előnyeit ötvözi: az elválasztástechnika (nevének megfelelően) a minta egyes komponenseit elválasztja egymástól, amelyekről a tömegspektrometria szerkezeti információt szolgáltat. Ez különösen komplex minták vizsgálata esetén fontos, kvalitatív és kvantitatív analízisre egyaránt alkalmas. A csatolt technika további előnye, hogy jelentős mértékben egyszerűsíti a minta-előkészítést, lerövidíti a minta tisztítására és dúsítására fordított időt. A kapcsolt technikák további előnye, hogy a kromatográfról eluálódó anyagokról az elúció ideje alatt több spektrum is felvehető. Elterjedésüket új ionforrások kifejlesztése tette lehetővé, mely kiterjesztette a módszer alkalmazhatóságát a nagyobb molekulatömegű, polárisabb komponensek irányába. A tandem tömegspektrometriával való kombináció a csatolt technikák érzékenységét és szelektivitását tovább növeli.

A már több mint 50 éve kifejlesztett gázkromatográfiával kapcsolt tömegspektrometria (GC-MS) illékony, hőstabil, kis molekulatömegű (< 600 Da) vegyületek érzékeny meghatározására alkalmas. A 80-as évek közepén kifejlesztett és a 90-es évektől kezdődően rutin analitikai technikának tekinthető atmoszférikus nyomású ionforrások (APCI, ESI) lehetővé tették a tömegspektrométer folyadékkromatográfiával történő hatékony összekapcsolását (HPLC-MS). Ez a csatolt módszerek alkalmazhatóságát az erősen poláris (vagy akár ionos szerkezetű), nagy molekulatömegű vegyületek irányába terjesztette ki. Ezzel lehetőség nyílt fehérjék, glikoproteinek, oligonukleotidok, és más biopolimerek szekvenciájának meghatározására, biológiai rendszerekben történő azonosítására is, poszt-transzlációs módosulások meghatározására. A GC-MS és HPLC-MS ma már rutintechnikának tekinthető, a gyógyszerkutatás-fejlesztés szinte valamennyi fázisában jelen vannak. A különböző kapcsolt technikák, ill. ionizációs módszerek kiválasztásának és alkalmazásának szempontjait sematikusan a 4.10. ábrán mutatjuk be.



4.10. ábra. A kromatográfias és ionizációs módszerek kiválasztásának szempontjai

A GC-MS technika, vagyis a gázkromatográfval történő MS-kapcsolás, viszonylag egyszerűen megvalósítható. A kromatográfban, gázfázisban elválasztott komponensek közvetlenül a tömegspektrométer nagyvákuumterében lévő ionforrásba juttathatók, ahol elektronütközéses vagy kémiai ionizáció valósítható meg. Gázkromatográfval illékony és termikusan stabil vegyületek vizsgálhatók. Az illékonyt származékképzéssel meg lehet növelni, így pl. karbonsavszármazékok, szteroidok GC-MS vizsgálata szililezést vagy metilezést követően megvalósítható. A gázkromatográfias elválasztás általában kapilláris

oszlopokon történik, amelyek segítségével akár pg-fg ( $10^{-12}$ – $10^{-15}$  g) szintű anyagmennyiségek is meghatározhatók. A módszer további előnye, hogy a spektrumok értékelését spektrumkönyvtár segíti.

A HPLC-MS, a nagyhatékonyságú folyadékkromatográfiával történő tömegspektrometriás kapcsolás csak néhány évtizede terjedt el, mivel számtalan technikai problémát kellett megoldani az on-line kapcsolat megvalósításához. Az egyik legnagyobb nehézséget a HPLC-ről áramló nagy mennyiségű folyadék (eluens) eltávolítása, majd az ionok nagyvákuum-térbe (analizátor) történő bejuttatása jelentette. Ezeket a technikai nehézségeket küszöbölték ki az atmoszférikus nyomáson működő ionforrások (ESI, APCI, APPI), melyek lehetővé tették a HPLC-MS rutinszerű használatát. Ezekkel az ionizációs módszerekkel a vizsgálható molekulák köre is jelentős mértékben kibővült. Szinte a teljes polaritási tartomány vizsgálható, kis és nagy molekulatömegű vegyületek molekulatömege egyaránt meghatározható, és a vegyületek szerkezetéről is értékes információ nyerhető.

HPLC-MS alkalmazások esetén legfontosabb követelmény, hogy az eluens rendszer csak illékony puffert (pl. ammónium-acetátot vagy -formiátot) tartalmazhat. A tömegspektrométeres vizsgálat érzékenységének növelésére gyakran szükséges az eluens savanyítása, mely a protonálódását segíti. Az oldószerek tisztasága szintén fontos követelmény. Az ionforrások széles áramlási sebesség tartományban (1  $\mu$ L/perc – 2 mL/perc) használhatók. Hagyományos analitikai oszlopok (ID 4,6 mm, szemcseméret 3,5-5  $\mu$ m) esetén a tipikus áramlási sebesség 0,5-2 mL/perc. HPLC-MS vizsgálatokhoz ideálisabbak a kisebb belső átmérőjű és szemcseméretű, ún. „narrow bore” oszlopok (ID 2,1 mm, szemcseméret  $\sim$  3  $\mu$ m), melyek  $\sim$  0,1-0,5 mL/perc áramlási sebességtartományban működnek. Az utóbbi években egyre gyakrabban alkalmaznak gyors kromatográfiás rendszereket (UHPLC), amelyek jelentős mértékben lecsökkentik a mérési időt jobb felbontás és jobb érzékenység mellett. Biológiai vizsgálatok esetén nanoHPLC-készülék használata tipikus (75-150  $\mu$ m oszlopátmérő, 1  $\mu$ L/perc vagy ennél is kisebb áramlási sebesség).

Az elválasztást követő tömegspektrometriás vizsgálat során ún. „total ion chromatogram” (TIC) nyerhető, amely a kromatográfiában gyakran használt UV/DAD detektálással analóg, de ezek érzékenysége és információ tartalma részben eltérő. Gyakran használják a „selected ion chromatogram”-ot is, amely az adott ion intenzitását mutatja az elúciós idő függvényében. A HPLC-MS vizsgálat érzékenységét, szelektivitását HPLC-MS/MS mérésekkel lehet növelni, melyek alkalmazásával

kis anyagmennyiségek vizsgálata biológiai/gyógyszertechnológiai rendszerekben is megvalósítható.

A CE-MS, vagyis a kapilláris elektroforézissel (CE) kapcsolt tömegspektrometria fontos új lehetőség, de a GC-MS és HPLC-MS technikákkal szemben még napjainkban sem tekinthető rutinmódszernek. A legnagyobb problémát a CE-elválasztáshoz szükséges nagyfeszültség, valamint speciális pufferek alkalmazása jelenti. A kapilláris elektroforézis különböző elválasztási móddal valósítható meg, amelyek közül a kapilláris zónaelektroforézis (CZE) főként töltéssel rendelkező molekulák elválasztására alkalmas és ES-ionforrással kapcsolható, míg a micelláris elektrokinetikus kromatográfia (MEKC) APCI-interfészsel használható.

### **4.3. A tömegspektrometria szerepe a gyógyszerkutatóban**

A tömegspektrometria olyan nagyhatékonyságú analitikai technika, amely a gyógyszerkutató/gyógyszerfejlesztés szinte valamennyi szakaszában/fázisában jelen van, kezdve a vegyületek előállításától egészen a törzskönyvezést követő mellékhatás-figyelésig. A soklépéses szerves preparatív előállítás során az egyes reakciólépések termékeinek tömegspektrometriás ellenőrzésével követik a szintetikus folyamatot, ill. sikeres előállítás után részletesen és pontosan igazolni kell a molekula és a szennyező komponensek szerkezetét, a minta tisztaságát, stb. Ezt követően a különböző preklinikai vizsgálatokban kell bizonyítani a hatóanyag megfelelő minőségét (kémiai analízis), hatékonyságát (klinikofarmakológiai és biokémiai vizsgálatok) és az alkalmazás biztonságosságát. Ezek részben állatkísérletek, részben pedig humán vizsgálatok. Ebben a folyamatban a tömegspektrometria az egyik leggyakrabban alkalmazott szerkezetvizsgálati módszer; mivel a GC-MS és HPLC-MS vizsgálatok minimális minta-előkészítés mellett, a vizsgálandó komponens izolálása nélkül is jól alkalmazhatók.

Az MS főként a szerkezetkutató és a farmakokinetikai vizsgálatok területén nélkülözhetetlen, amikor a hatóanyag/készítmény szerkezetét, tisztaságát, bomlástermékeit, ill. a gyógyszer szerkezetben belüli változását kell meghatározni (ADME, ADMETox). A tömegspektrometria legnagyobb előnye, hogy kis anyagmennyiségek komplex mátrixban (pl. testfolyadékban, gyógyszerkészítményben) történő meghatározására alkalmas. Ez elengedhetetlenül szükséges bioanalitikai vizsgálatok esetén (metabolitok, farmakológiailag aktív metabolitok). A szennyezés- és

bomlástermékprofilat használják alapanyagok, segédanyagok, gyártásközi termékek, csomagolóanyagok, késztermékek minőségi vizsgálatok, továbbá kompatibilitás és gyógyszer-interakciók meghatározására is.

### **4.3.1. Hatóanyagok, segédanyagok, gyógyszer technológiai késztermékek vizsgálata. Szennyezők/szennyezésprofil, stabilitás (bomlástermékek), kompatibilitás vizsgálatok**

A gyógyszer kutatás-fejlesztés első lépése a hatóanyagok jellemzése, amely a vegyület molekuláris szerkezetének és tisztaságának meghatározása. Ezekben az esetekben a tömegspektrometria minőségi és mennyiségi információt szolgáltat mind a hatékony molekuláról, mind pedig a szennyező komponensekről. Ez általában elválasztástechnikai módszerekkel kapcsolt MS-módszer alkalmazásával történik (pl. HPLC-MS, HPLC-MS/MS), kihasználva a kombinált technikák előnyeit, a szelektivitást, nagy érzékenységet és a tandem tömegspektrometriás mérési technikákból nyerhető szerkezeti információkat. Meg kell említeni, hogy más szerkezetvizsgáló (NMR, IR, röntgen) és elválasztástechnikai módszerek (HPLC/DAD, HPLC/elektrokémiai detektor stb.) alkalmazása szintén tipikus és fontos. A hatóanyag szennyezői lehetnek a szintézis során el nem reagált kiindulási anyagok, a reakció köztes és melléktermékei, esetleg katalizátorok, a reakcióhoz szükséges segédanyagok, oldószer-maradványok, ill. egyéb idegen eredetű szennyezők. A szennyező-komponensek és a bomlástermékek minőségére, ill. mennyiségére vonatkozó ajánlásokat a gyógyszerügyi hatóságok harmonizációs (ICH) dokumentumai tartalmazzák. Az oldószer-maradványok meghatározása elsősorban gázkromatográfiával kapcsolt tömegspektrometriás módszerrel történik, míg más vegyületek meghatározására molekulatömegüknek és polaritásuknak megfelelő analitikai technikát kell használni. A rokon szerkezetű szennyező, ill. bomlástermékek vizsgálatok a kidolgozott analitikai módszernek a várhatóan toxikus komponensek azonosítására és mennyiségi analízisére is alkalmasnak kell lennie. Az utóbbi időben különösen fontossá vált a genotoxikus szennyezők analitikája is.

A gyógyszerek törzskönyvezéséhez nem csak a hatóanyagokat kell széleskörűen szerkezet, tisztaság, stabilitás stb. szempontjából jellemezni, hanem a készítményeket is. A fejlesztés szakaszában a gyógyszerformát vizsgálni kell stabilitási és kompatibilitási szempontból: (a) hatóanyag-interakció a segédanyagokkal, (b) több hatóanyagot tartalmazó készítmény esetében a hatóanyagok és a segédanyagok kompatibilitása, ill. (c) a

készítmény alkalmazhatósága szempontjából bekövetkező étel-interakció. Ezek a vizsgálatok originális fejlesztés és generikumok formulálásakor egyaránt fontosak. A stresszvizsgálatok során (savas, lúgos közegben, oxidáció, fotostabilitás, hőmérséklet, páratartalom stb. hatása), az előzőekhez hasonló módon, szerkezetazonosításra, szennyezésvizsgálatra és mennyiségi analízisre alkalmazzák a tömegspektrometriát.

### 4.3.2. Metabolitkutatás

Metabolitok szerkezetének és mennyiségének meghatározása a tömegspektrometria másik fontos alkalmazási területe a gyógyszerkutatásban. Tipikus az elválasztástechnikai módszerekkel kombinált tömegspektrometria alkalmazása, amikor is kis anyagmennyiségeket összetett biológiai mintákban kell meghatározni. Ez történhet állatokban (pl. egér, patkány, törpesertés, kutya vérplazmából, vizeletből, székletből, gerincfolyadékából, agyhomogenátumból stb.), humán mintákban, vagy máj mikroszómában. Ezekben a vizsgálatokban a molekulatömegtől, polaritástól függően választjuk ki az alkalmazandó GC-MS, HPLC-MS, ill. az ezekkel kombinált tandem tömegspektrometriás módszert. Ezekre a specifikus „state-of-art” módszerekre és gyakran összetett minta-előkészítésre a ng/mL, pg/mL szintű anyagmennyiségek szelektív meghatározására miatt van szükség.

A metabolitok szerkezetmeghatározása többféle módon történhet, melynek kiválasztását az adott feladat határozza meg. Metabolomikai vizsgálatok esetén gyors szűrőmódszert alkalmaznak. Ez esetben nagyszámú, gyors HPLC-MS kromatogram alapján valószínűsítik a lehetséges metabolikus folyamatokat, ill. az ezekben képződő metabolitok szerkezetét. Ennél lényegesen pontosabb adatok is nyerhetők, ehhez azonban szükséges a hatóanyag és a vegyületcsalád kromatográfiai és tömegspektrometriás viselkedésének részletes ismerete. Ennek során különböző állatokból származó biológiai mintákban lehet azonosítani a keletkezett metabolitokat. A már ismert szerkezetű metabolitokat gyakran más mintákban (pl. más fajban vagy más mátrixban) is ki kell mutatni. Ez esetben speciális HPLC-MS/MS technikát érdemes használni (pl. MRM-et), így az azonosítás kis mennyiségű híg mintában is elvégezhető.

A gyógyszerügyi hatóságok követelményeinek megfelelően a metabolitkutatás első lépése az ADME-folyamatok I. fázisú metabolikus reakcióiban keletkező metabolitok (aktív metabolitok) szerkezetének és

mennyiségének szpecíeszfüggő, lehető legpontosabb meghatározása. Ezt követően a II. fázisú metabolikus reakciókban létrejövő konjugátumok milyenségét és mennyiségét, valamint a fehérjekötődés mértékét is meg kell határozni.

### **4.3.3. Kvantitatív mérések (farmakokinetika), validálás**

A gyógyszerkutatás során nemcsak a hatóanyagok, szennyező-komponesek, bomlástermékek, metabolitok szerkezetét kell meghatározni, hanem azok mennyiségét is, gyakran rendkívül sok komponenst tartalmazó rendszerekben. A vizsgálandó komponensek a mintákban gyakran csak igen kis mennyiségben (pmol, fmol) vannak jelen. A tömegspektrometria elválasztástechnikai módszerekkel kapcsolva alkalmas nagyszámú minta gyors elemzésére, a hatóanyag és/vagy a farmakológiai aktív metabolitok és belső standardok specifikus, szelektív, egymás melletti analízisére. Ezeket a vizsgálatokat gyakran a GLP követelményeinek megfelelően kell elvégezni. A kromatográfiához csatolt tandem tömegspektrometriát nagy érzékenysége és nagy szelektivitása miatt gyakran alkalmazzák pl. farmakokinetikai és bioekvivalencia vizsgálatokban. A farmakokinetikai vizsgálatok során a különböző biológiai mintákban meghatározott hatóanyag-koncentráció/idő görbe értelmezésével lehetőség van számos olyan farmakokinetikai paraméter meghatározására (pl. max. plazma-koncentráció, ennek eléréséhez szükséges idő, a plazmakoncentráció-idő görbe alatti területe, az ún. „clearance”, stb.), amelyekkel jellemezni lehet a szervezetben lejátszódó folyamatokat.

A (bio)analitikai, ezeken belül is a kvantitatív mérési módszereket validálni szükséges, vagyis dokumentáltan igazolni kell, hogy a módszer alkalmas az adott minták vizsgálatára adott körülmények között. A validálási paraméterek jellemzik a minta-előkészítést, a standard oldatokat, eluenseket, a készülékeket és az adatok értékelését is. Az ún. teljesítményjellemző adatokra vonatkozó elvárásokat a nemzeti, ill. az európai gyógyszerügyi hatóságok határozzák meg. Ezek közül a legfontosabb a módszer specífcitása, szelektivitása, a mérés linearitási tartománya, a legkisebb mérhető és detektálható anyagmennyiség, a pontosság, a torzítatlanság, rendszeralkalmassági adatok és a biológiai minta stabilitása. A mérési eredményeket statisztikai módszerekkel értékelik és pl. szórásadatokkal jellemzik. A kvantitatív módszerfejlesztés és validálás különös figyelmet és körültekintést igényel, a kidolgozott analitikai eljárások gyakran komplexek módszerek (pl. HPLC-DAD-MS/MS) alkalmazását igénylik.



## 4.4. Makromolekulák vizsgálata (fehérjék, fehérjealapú gyógyszerek)

A tömegspektrometriai kutatások súlypontja az elmúlt évtizedben a makromolekulák, elsősorban a fehérjék vizsgálatának irányába tolódott el.<sup>9</sup> A mérési módszerek, ionizációs technikák fejlődésével lehetővé vált igen kis mennyiségben rendelkezésre álló proteinek szekvenciájának, sok komponenst tartalmazó minták protein-összetételének meghatározása, valamint sok más, a fehérjekutatásban fontos probléma megoldása. Makromolekulák esetén, a kis szerves molekulákhoz hasonlóan, a tömegspektrometria legfontosabb előnye a nagy érzékenység és specifitás, amely lehetővé teszi proteinkeverékek minor komponenseinek vizsgálatát is. Hátránya azonban, hogy a proteinek térszerkezetéről csak minimális információt nyújt, ehhez más szerkezetvizsgáló módszerek szükségesek (pl. NMR, röntgendiffrakció, IR).

A gyógyszerkutatás fontos új iránya a fehérjealapú gyógyszerek kifejlesztése és alkalmazása. Ezek közül a legfontosabbak a monoklonális antitestek (MAB-ok), melyeket tipikusan rekombináns technológiával állítanak elő. Az ilyen típusú molekulák szerkezetvizsgálata, analitikai jellemzése alapvetően eltér a hagyományos gyógyszerek esetén alkalmazottaktól. A legjellemzőbb különbség, hogy sokszor már a fehérje szerkezete sem egyértelmű, gyakran számos, akár sok millió homológ keverékből is állhat, amelyek nagy része poszt-transzlációs módosulat (PTM). A fehérjealapú gyógyszerek vizsgálata, jellemzése során gyakran alkalmaznak különböző biológiai, immunológiai módszereket, amelyek biológiai szempontból fontos, toxikus módosulatok jelenlétét zárhatják ki. A műszeres analitikai módszereket főként nem „hagyományos” szerkezetkutatásra, hanem a fehérjék jellemzésre használják: például egy nagyobb fehérjemolekula NMR-spektruma ujjlenyomat-szerűen jól jellemzi az adott fehérjemintát, annak térszerkezetét és az ebben bekövetkező változásokat, de a teljes (tér)szerkezet ez alapján általában nem határozható meg.

A tömegspektrometria a következő területeken használható a fehérjealapú gyógyszerek vizsgálata során: (a) a fehérje pontos szekvenciájának meghatározása; b) homológok (elsősorban PTM-ek, ezen belül is a glikoformák) jelenlétének, ezek mennyiségének jellemzése; és (c) az esetleges szennyezések kimutatása. Bár egész fehérjemolekulákat is lehet vizsgálni tömegspektrometria segítségével, a fehérjét általában enzimatisz emésztéssel kisebb darabokra hasítva analizálják. Az analízis



során leggyakrabban MALDI és ESI ionizációt használnak, ez utóbbi esetén jellemzően folyadékkromatográfiával való kapcsolással.

A fehérjealapú gyógyszerek vizsgálata általában a következő kísérleti metodológiával történik: (1) a fehérjét proteolitikus enzimek (leggyakrabban tripszin) segítségével peptidekre hasítják, majd (2) az így kapott peptidkeveréket HPLC-ESI-MS/MS módszerrel vizsgálják. Tipikus fordított fázisú (reversed phase) kromatográfiás oszlop, gradienselúció és hosszú (~ 100 perces) futásidő alkalmazása, hogy a MAB-ok esetén akár 100-200 peptidet is tartalmazó minta egyes komponensei egymástól elváljanak. A HPLC-MS vizsgálat során kapott tömegspektrumokból az egyes komponensek molekulatömegét meg lehet határozni, de a peptidek azonosítására ez nem elegendő. Az analízis következő lépése (3) a tandem tömegspektrometriás vizsgálat (HPLC-MS/MS), amikor az oszlopról eluálódó peptidek molekulaionjainak fragmentációja során jellemzően a peptidlánc az egyes aminosavak között töredezik. A spektrumban gyakran azonosíthatók ún. ionsorozatok. Az így képződő fragmentumok közötti tömegkülönbség az adott aminosav tömegénél 18 Da-nal ( $H_2O$  molekula tömegével) kisebb. Ezen ionsorozatok alapján az egyes aminosavak tömege és a peptidszekvencia meghatározható (4.9. ábra). A peptidek és fehérjék szekvenciameghatározását nagymértékben segíti az analízis automatizálása (pl. 'data dependent analysis') és a mérési eredmények automatikus értékelése (pl. a Mascot programcsomag segítségével), mely a peptidszekvenciák automatikus meghatározására vezet. Ezek a módszerek nagyban hozzájárultak ahhoz, hogy a tömegspektrometria a proteinkutatás és a proteomika egyik fő eszközévé váljon.

Fehérjealapú gyógyszerek esetében alapvető követelmény, hogy a teljes protein szekvenciáját meg kell határozni. A fent ismertetett, nagyrészt automatizált módszerekre épülő eljárás tipikusan csak a protein szekvenciájának egy részét azonosítja. Ennek számos oka van, mint pl. a PTM-ek nem megfelelő figyelembevétele, egyes peptidek kis érzékenysége, MS/MS spektrumok hibás vagy nem elegendően részletes értékelése, vagy egyes fragmentációs folyamatok hiánya. A teljes szekvenciameghatározás rendkívül időigényes folyamat, amely sok kísérletes munkát (különböző, specifikus enzimek, speciálisan beállított MS/MS mérések), manuális (nem automatikus, bár számítógépes eljárásokkal támogatott) értékelést és jelentős tapasztalatot igényel.

A poszt-transzlációs módosulások meghatározása az egyik legnehezebb analitikai feladat a fehérjealapú gyógyszerek analízise során. Ez jelentős mértékben speciális enzimikus módszerek alkalmazásán, kromatográfián, tömegspektrometrián, és ezek kombinációján alapul.

A tömegspektrometriának különösen a glikoziláció leírása, glikoformák azonosítása és ezek mennyiségi meghatározása vonatkozásában van nagy jelentősége, de ez ma még nem rutinfeladat.

## 4.5. Irodalom

1. (a) Cornides I., *Gyakorlati Tömegspektroszkópia*. Műszaki könyvkiadó: Budapest, **1975**; (b) Dinya Z., *Szerves tömegspektrometria*. DE Kossuth Egyetemi Kiadó: Debrecen, **2001**; (c) McLafferty, F. W.; Turacek, F., *Interpretation of Mass Spectra*. Univ. Science Books: **1996**; (d) Újszászy K.; Frigyes D., *Tömegspektrometria Oktatási segédanyag*. ELTE Általános és Szervetlen Kémia Tanszék: Budapest, **2003**; (e) Lee, M. S., *Mass Spectrometry Handbook*. Wiley, **2012**.
2. (a) Gross, J. H., *Mass spectrometry: A textbook: Second edition*. Springer, **2011**; p 1; (b) Ekman, R.; Silberring, J.; Westman-Brinkmalm, A.; Kraj, A., *Mass Spectrometry: Instrumentation, Interpretation, and Applications*. Wiley, **2008**.
3. Hillenkamp, F Peter-Katalinić, J., *MALDI MS: A Practical Guide to Instrumentation, Methods and Applications*. Wiley, **2007**;
4. Ferrer, I.; Thurman, E. M., *Liquid Chromatography Time-of-Flight Mass Spectrometry*. Wiley: **2009**.
5. Busch, K. L.; Glish, G. L.; McLuckey, S. A., *Mass Spectrometry/Mass Spectrometry: Techniques and Applications of Tandem Mass Spectrometry*. VCH Publishers: New York, **1988**.
6. Vékey K.; Telekes A.; Vértes Á., *Medical Applications of Mass Spectrometry*. Elsevier: Amsterdam, **2008**.
7. Jakubowski, N.; Prohaska, T.; Rottmann, L.; Vanhaecke, F., Inductively coupled plasma- and glow discharge plasma-sector field mass spectrometry: Part I. Tutorial: Fundamentals and instrumentation. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* **2011**, 26 (4), 693.
8. Keserű Gy. M., *A gyógyszerkutató kémiaja*. Műszaki Könyvkiadó: Budapest, **2011**.
9. Hevér H.; Ludányi K.; Drahos L.; Vékey K., A tömegspektrometria alkalmazása fehérje alapú gyógyszerek szerkezetvizsgálatára és jellemzésére. *Magyar Kémiai Folyóirat* **2013**, 119 (1), 46.
10. Bristow, A. W. T., Accurate mass measurement for the determination of elemental formula - A tutorial. *Mass Spectrometry Reviews* **2006**, 25 (1), 99.
11. Leslie, A. D.; Volmer, D. A., Dealing with the masses: A tutorial on accurate masses, mass uncertainties, and mass defects. *Spectroscopy (Santa Monica)* **2007**, 22 (6), 32.
12. Cole, R. B., *Electrospray and MALDI Mass Spectrometry: Fundamentals, Instrumentation, Practicalities, and Biological Applications: Second Edition*. Wiley, 2012.
13. Koppenaal, D. W.; Barinaga, C. J.; Denton, M. B.; Sperline, R. P.; Hieftje, G. M.; Schilling, G. D.; Andrade, F. J.; Barnes Iv, J. H., MS detectors. *Analytical Chemistry* **2005**, 77 (21), 418 A.
14. Sleno, L.; Volmer, D. A., Ion activation methods for tandem mass spectrometry. *Journal of Mass Spectrometry* **2004**, 39 (10), 1091.

# 5. Egykristály-röntgendiffrakció

*Bombicz Petra, Fábíán László, Kálmán Alajos*

## 5.1. Bevezetés

Az emberi civilizáció fejlődésének egyik fontos lépése volt a környezetben fellelhető kristályos anyagok felismerése, gyűjtése, majd különböző formában történő hasznosítása. A kristályok „atomi” rácsszerkezete jelentősen befolyásolhatja tulajdonságaikat, viselkedésüket. A több évszázadra (XVI–XX. század) visszanyúló megfigyelések és értékes felismerések ellenére csak a röntgendiffrakció felfedezésével (1912), majd első felhasználásával (1913) nyílt meg az út a rácsszerkezetek felderítéséhez, és egy új világ formálásához. Ezt természetesen a „korai adatgyűjtés” hosszú periódusa előzte meg. A különböző formájú és nagyságú síklapokkal bezárt (fémes, nemfémes, avagy áttetsző) formákat ásványoknak (*minerals*) nevezték el. Georgius Agricola német orvos már 1556-ban szín, átláthatóság, csillogás, keménység, hajlékonyság, illetve hasadás szerint osztályozta az ismert ásványokat. A gyarapodó megfigyelések során Nicolaus Steno ismerte fel (1669), hogy a kristályokat (konvex poliéderek) körülzáró síkok különböző szimmetriákkal jellemezhetők, és az általuk bezárt szögek, a lapok méretétől függetlenül állandóak. A lapszögek állandóságának törvényét követve, szögmérővel, majd optikai goniométerekkel elvégzett szögmérések vezettek a felismeréshez, hogy tükrözések, továbbá forgástengelyek (gírek) által összekapcsolt lapformák hét tengelykeresztben értelmezhetők (Christian S. Weiss, 1815, majd Friedrich Mohs, 1825). Az inverzió ( $\bar{1}$ ) kombinálása a gírekkel (2, 3, 4, 6) három újabb szimmetriaműveletet eredményez:  $\bar{2} = m$ ,  $\bar{3}$ ,  $\bar{4}$ . Ha a nyolc műveletet a hét rendszernek elnevezett tengelykeresztben (triklin, monoklin, rombos, trigonális, tetragonális, hexagonális és köbös) értelmezzük, 32 kristályosztályhoz jutunk, amit Johann Hessel írt le először (1830). A 32 kristályosztály vizsgálatával, azaz a külső szimmetriákból a kristályok belső szerkezetét megismerni lehetetlen.

A morfológiai vizsgálatok folytatódtak. René Just Haüy-t a kalcit ( $\text{CaCO}_3$ ) kitűnő romboéderez hasadásának tanulmányozása vezette (1784) mérföldkövet jelentő felismeréséhez. Szerinte a folytatólagos hasítás, legalábbis elvileg, oly apró paralelepipedonokra vezethet, amelyek sem szemmel, sem nagyítóval nem láthatók. Elméletében a kristályok legapróbb részei (*molécules intégrantes*) az illető kristályra jellemző alakú

elemi paralelepipedonok, s ezek szoros illeszkedéséből épül fel a kristály. A „*molécules intégrantes*” alakja az illető kristályrendszer legegyszerűbb formájának felel meg. Haüy elméletéből kiindulva Gabriel Delafoss (1840) kimondta, hogy a „*molécules intégrantes*” fizikai, illetve kémiai jellemzőktől független geometriai elem. Ezt ma elemi cellának nevezzük. 1848-ban Auguste Bravais a 32 kristályosztály ismételt levezetése mellett 14 térrácsot javasolt. Rácselméletének alapja a translációval létrehozott végtelen pontsor, melynek ortogonális vagy nemortogonális (*oblique*) translációjával történő megsokszorozása adja a síkrácsot. A síkrácsok azonos távolsággal történő egymásra helyezése adja a térrácsot, amelynek egysége az elemi cella. A háromdimenzióban értelmezett pontsorok ortogonalitása, illetve annak hiánya alapján kimutatta, hogy a 14 rács hét különböző rácsszimmetriát foglal magában. Ezek a korábban felismert hét kristályrendszer primitív elemi cellái. A további hét, ún. centrált rács pedig úgy jön létre, hogy a primitív cellák (pl. triklin vagy monoklin) társításával (2 vagy 4 cellát felhasználva) a megnövelt térfogatban további szimmetriaműveletek értelmezhetők.

Bravais translációkra épülő térrácsa a tércsoportelmélet előfutára. Azonban ez is kevés az utolsó fő kérdés megválaszolására: hogyan rendeződnek el az atomok az elemi cellában? Leonhard Sohncke 1879-ben két új szimmetriaelemet ismert fel: a csavartengelyt és a csúszósíkot. Ezt követően az orosz E. S. Fedorov elsőként vezeti le (1885) a 230 tércsoportot. Fedorovtól függetlenül ugyanerre az eredményre jut Arthur Schönflies német matematikus (1891), majd harmadikként az angol William Barlow, aki modellkísérletek alapján közli (1883) öt köbös rendszerű kristály, köztük a kös szerkezetét. Sohncke ezek helyességét megkérdőjelezi, a válasz: a 230 tércsoport független levezetése (1894).

Tovább lépés a röntgensugárzás felfedezése (1895), amelynek valós természetéről 1912-ig csak ellentmondó sejtések vannak. A történelmi jelentőségű Laue-kísérlet egyszerre igazolta az X-sugárzás hullámtermészetét, interferenciája pedig a kristályok rácsszerkezetét. Ebből kiindulva William Henry és William Lawrence Bragg (apa és fia), a Barlow–Pope-féle modellek segítségével (1913) értelmezték az első kristályokról (NaCl, KCl stb.) készült röntgenfelvételeket, többek között kimutatva, hogy Barlow spekulatív szerkezeti modelljei közül csak a gyémánt volt hibás. Hat évvel később Paul Niggli (1919) ismerte fel, hogy az általa homogén diszkontinuumnak nevezett kristályrácsok szerkezetének leírásához nélkülözhetetlen a 230 tércsoport használata.

A röntgendiffrakciós szerkezetmeghatározások tárgya az első évtizedekben elsősorban az ásványok kristályai. A szerves kristályok

vizsgálatát a krisztallográfiai fázisprobléma megoldásának nehézségei és a primitív felvételtechnika késleltette. Fellendülés csak a II. világháborút követő években indult meg. Az első kiemelkedő eredmény az abszolút konfiguráció meghatározása, amely igazolta Emil Fischer (1902. évi kémiai Nobel-díj) zseniális megsejtését. Ugyanis az anomális diszperzió gerjesztésével (J. M. Bijvoet és munkatársai, 1949–1951) érvénytelenné válik a Friedel-törvény, amely szerint a röntgendiffrakciós kép a kristály eredeti szimmetriájától függetlenül centroszimmetrikus.

A röntgendiffrakció vitathatatlan prioritása az abszolút konfiguráció eldöntésében segített, hogy fokozatosan elfoglalhassa helyét a kémia más területein is. Ezek közül kiemelkedő a polimorfia és az izostrukturalitás vizsgálata. Ugyanis a XIX. század elején felismert izomorfia (1819), majd polimorfia (1821) tanulmányozása is a morfológia, valamint a fizikai állandók vizsgálatára korlátozódott. Napjainkban a polimorfia térszerkezeti okainak felderítésében a röntgendiffrakció kitüntetett szerepet játszik. Ugyancsak a röntgendiffrakció alkalmazása tette lehetővé, hogy a morfológiai megfigyelésekből leírt izomorfia helyett a kristályok izostrukturalitását vizsgáljuk. A fejezet végén található 5.1. táblázatban gyűjtöttük össze azokat a vegyületeket, melyek szerkezetét az alábbiakban tárgyaljuk.

## 5.2. Röntgendiffrakciós vizsgálatok

Az anyag tulajdonságainak minél alaposabb megértése céljából mind részletesebben kell megismernünk a szerkezetét.<sup>1-5</sup> 1912-ig az atomok világa reménytelenül kívül esett a közvetlen megfigyelhetőségen. A tudománytörténet egyik legfontosabb felfedezése a röntgensugarak diffrakciójának megfigyelése volt.<sup>6</sup> A diffrakciós technikák tették lehetővé az anyag atomi szintű megismerését. A röntgendiffrakció mintegy atomi felbontású mikroszkópként szolgál,<sup>7</sup> megnyitva az utat a modern szilárdtestkémia és az anyagtudományok fejlődése előtt.

A gyógyszerkutatók célja megkívánt kémiai és fizikai tulajdonságú anyagok előállítására. Fontos, hogy adott polimorfot állítsanak elő kontrollált és reprodukálható körülmények között. Az egykristály-röntgendiffrakció alkalmazásával felismerhetők a molekulák, azok konformációja és abszolút konfigurációja, valamint a molekulák közötti kölcsönhatások. A molekula-, ill. funkciócsoport-felismerés lehetővé teszi a molekuláris felismerési folyamatok megértését, a protein-ligandum kölcsönhatások tanulmányo-

zását, a hatásmechanizmus felderítését, a racionális gyógyszerhatóanyag-tervezést.

A krisztallográfia interdiszciplináris tudományág, amely a szilárd fázisú anyagokat tanulmányozza szerkezeti szempontból.<sup>1-3,8</sup> A krisztallográfia elméleti alapjai az 1920-as évekre elérhetővé váltak, a krisztallográfia ezt követő eredményessége a diffrakciós készülékek és a számítógépek fejlődésének, valamint a fázisprobléma megoldásának köszönhető.<sup>8</sup>

A legtöbb spektroszkópai technikában a mintán meghatározott irányban áthaladó sugárintenzitás változását mérjük a frekvencia/hullámhossz változtatásával. Az intenzitásváltozást a meghatározott frekvenciájú sugárzások abszorpciója okozza, amely energiaváltozásokhoz vezet a mintában. Az egykristály-, valamint a por-röntgendiffrakciós technikáknál a szilárd anyag és a sugárzás kölcsönhatása ettől eltérő: a hullámhosszat tartjuk állandó értéken, és a monokromatikus szórt sugár intenzitását mérjük az irány függvényében. Ebből meghatározhatóak az atomi pozíciók a mintában, amiből aztán a szerkezet teljes geometriai leírása megadható.<sup>4,9</sup> A diffrakciós technikák sokkal részletesebb szerkezeti információt adnak, mint a spektroszkópai módszerek, azonban a vizsgálható anyagok köre szűkebb. Csak megfelelő belső rendezettséggel bíró és megfelelően fejlett méretű egykristályról tudunk detektálható intenzitású szórt sugárzást kapni. Egykristály-diffrakcióval ásványok, szervetlen és szerves anyagok, sók és molekulák, fehérjék és vírusok szerkezete határozható meg. Megismerhető a kristályt felépítő molekulák kompozíciója, konstitúciója, konfigurációja és konformációja (4k, angolul 4c), a molekulák közötti másodlagos kölcsönhatások, valamint az, hogy hogyan illeszkednek a szimmetriák által egymáshoz rendelt egységek a kristályrácsban. Mindezekből következtethetünk az anyag fizikai-kémiai tulajdonságaira.

Az egykristály-diffrakciós mérés eredményeként felismerjük a molekulát az elektronsűrűségi csúcsokból, és így lehetővé válik a kötéstávolságok, kötésszögek és torziós szögek, azaz a molekula összetételének és geometriájának egzakt leírása, királis molekulák esetén az abszolút konfiguráció megállapítása. Felderíthető a különböző konformerek aránya, a rendezetlen atomi pozíciók betöltöttsége. A szupramolekuláris kémia térhódításával nagy hangsúlyt fektetnek a másodlagos kötőerők és egyéb intermolekuláris kölcsönhatások vizsgálatára homo- és heteromolekuláris társulásokban. Hatóanyag-tervezés céljából fontos a molekula-felismerés (ill. funkciós csoport-felismerés) krisztallográfiai jellemzőinek megismerése. A pontos hidrogénpozíciókat neutrondiffrakciós méréssel állapíthatjuk meg. Nagyfelbontású mérésekből nagy pontossággal számolható a deformációs elektronsűrűség, és a kötő elektronok és magános



elektronpárok is meghatározhatók. Tanulmányozhatjuk a kristályos anyagok polimorfiját, és egymástól csak kismértékben különböző molekulák, ill. molekulatársulások izostrukturalitását. A szerkezeti adatok lehetőséget nyújtanak az analitikai eredmények értelmezésére.

A kristályos anyag egy vagy több komponensből épül fel, amelyek szabályosan ismétlődnek minden térirányban. A rendezett szerkezetben az építőelemek között szimmetriák ismerhetők fel: transláció, szimmetriacentrum, forgástengely, tükörsík, és ezek kombinációi. Az elemi cella az a legkisebb egység, amelyből sokszori eltolással a kristály felépíthető. Az aszimmetrikus egység az elemi cella azon legkisebb része, amelyben szimmetria már nem található. Az aszimmetrikus egység tartalmazhat egy molekulát, több molekulát vagy egy molekula töredékét, ha a molekula önmagában szimmetrikus.

Az optikai mikroszkóppal még látható legkisebb tárgy méretét a vizsgáló fény hullámhossza (400-700 nm) szabja meg. A molekulák mérete százszor, ezerszer kisebb ennél. A röntgensugár könnyen előállítható rövid hullámhosszú elektromágneses sugárzás, amelynek hullámhossza az atomi távolságok nagyságrendjébe esik.<sup>10</sup> A leggyakrabban alkalmazott  $K\alpha$  hullámhosszak a röntgenanód anyagának függvényében: Co:  $\lambda = 1,7928 \text{ \AA}$ ; Cu:  $\lambda = 1,54178 \text{ \AA}$ ; Mo:  $\lambda = 0,7107 \text{ \AA}$  és Ag:  $\lambda = 0,5608 \text{ \AA}$ . A röntgensugár előállítása és alkalmazása laboratóriumi méretekben is lehetséges hagyományos röntgengenerátorokkal (1-2 kW), nagyobb intenzitású (15 kW) forgó anódú röntgensövekekkel, vagy a még fényesebb és nagyobb fluxusú mikrofókuszú röntgengenerátorokkal. A szinkrotronforrásnál a kilométeres sugarú körpályán mozgó-gyorsuló töltések keltik a nagy intenzitású röntgensugárzást, amely lehetővé teszi egészen kisméretű kristályok vizsgálatát is. A sugárzás  $10^{-10}$  sec impulzusokban érkezik a mintára, az impulzusjelleg lehetőséget ad különböző folyamatok időbeli lefutásának vizsgálatára. A jövőben nagy jelentőségűvé válik a röntgen-szabadelektronlézer mint új típusú forrás. Míg a röntgensugár az elektronfelhőn, a neutron az atommagon szóródik. Az egykristály-neutrodiffrakció módszerével a nehéz- és könnyűatomok helyzete közel azonos pontossággal meghatározható, az atomi pozíciókat és az elmozdulási tényezőket nem befolyásolják a kémiai kötések. Alkalmazását megnehezíti, hogy költséges a forrás megépítése, és hogy nagyobb méretű egykristály szükséges a kisebb intenzitás miatt.

Ahhoz, hogy detektálható intenzitású szórt sugarakat kapjunk, nagyfokú rendezettséggel bíró, megkívánt szórési térfogatot képviselő egykristály szükséges. A diffrakciós kép így egy nagyságrendileg  $10^{18}$  számú celláról készült kiátlagolt felvétel. Az egykristály-diffrakciós vizsgálathoz egy

minél inkább rácshibáktól mentes, hagyományos röntgenforrás esetén 0,1-0,5 mm élhosszúságú mérettartományba eső egykristály szükséges. A kristályosítás anyagigénye 1-2 mg a vizsgálni kívánt anyagból és pár ml oldószer. A kristály növekedését befolyásoló tényezők az anyag oldhatósága az oldószerben, a göcképződés és göcnövekedés sebességének aránya, a mechanikai hatások és az idő. Olyan oldószert érdemes választani, amelyben az anyag mérsékeltén jól oldódik. A göcnövekedés sebességének nagyobbnak kell lennie a göcképződés sebességénél. Az oldat rázkódását, valamint az idegen anyaggal történő beoltást, a heterogén nukleációt el kell kerülni (szűrőpapírszál-maradék, laboratórium levegőjében lévő por). Az egykristálynövesztés időigényes folyamat, a többnapos, sőt többhetes időigény sem ritka.

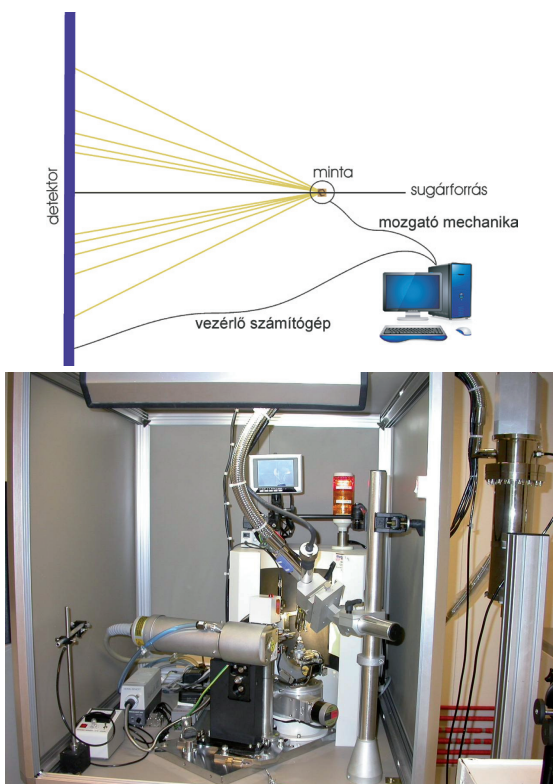
Egykristály növesztése céljából számos módszer közül választhatunk. Szabályozhatjuk az oldószer párolgási sebességét. Csökkenthetjük a telített oldat hőmérsékletét, akár felmelegített oldat lassú lehűtésével, vagy az oldat szobahőmérsékletnél alacsonyabb hőmérsékletre való hűtésével. A kristályosító edényben hőmérsékletgradienst állíthatunk elő. Az oldószer minősége meghatározó, de alkalmazhatunk oldószerkeverékeket is. Gőzdiffúzió esetén az anyag oldatát egy másik oldószer gőzébe helyezzük; ez akkor alkalmazható, ha az oldószerkeverékben az oldhatóság rosszabb. Oldószer-diffúzió esetén az oldat és egy másik oldószer egymásra vannak rétegezve, a kristálynövekedés a határfelületen zajlik. A reaktánsdiffúziós módszert akkor alkalmazzuk, ha a termék oldhatósága kisebb a kiindulási anyagénál. Együtt kristályosíthatjuk az anyagunkat semleges vagy ionos kokristályképzővel. Ionos anyag esetén az ellenion cseréje eredményre vezethet. Semleges anyagot ionos formává alakíthatunk. A másodlagos kötések ki-, ill. átalakítása előnyös lehet. Illékony anyagok esetén a megfelelő kristályméretet megkaphatjuk szublimációval. Túl nagy egykristályt megfelelő méretűre vághatunk, azonban a mechanikai hatás a rácspan feszültséget kelthet, ez a kristály minőségét rontja.

A kristályosításhoz használt oldószerek, oldószerkeverékek kiválasztásának szempontjai: oldhatóság, reaktivitás, hidrofóbicitás, polaritás, illékonyosság, forrás-, ill. olvadás-hőmérséklet, protikus-aprotikus tulajdonság. Az oldószer jelen lehet a kristályrácsban térkitöltőként, ilyenkor gyakran rendezetlen pozícióban van az üregben, de gyakran részt vesz a kristály hidrogénkötés-rendszerében, harmadrészt pedig komplexekben az oldószer a központi fémion köré koordinálódhat. Ugyanaz az oldószer egyszerre több szerepet is betölthet a kristályrácsban. Szerves és fémorganikus anyagok kristályosításához leggyakrabban alkalmazott



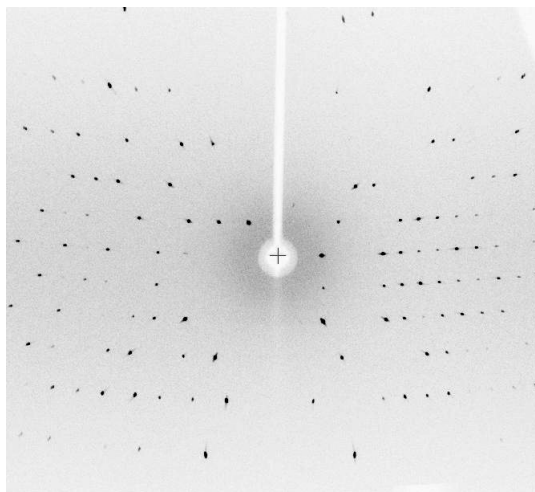
oldószereket, és azok zárványként való előfordulási gyakoriságát Görbitz és Hersleth<sup>11</sup> foglalta össze.

A két Bragg már egy évvel az első diffrakciós kísérlet után, 1913-ban meghatározta számos egyszerűbb kristály szerkezetét. A módszer és alkalmazása gyorsan elterjedt. Az 1924-ben kifejlesztett Weissenberg-kamerát évtizedekig használták a diffrakciós kép regisztrálására. A 60-as években terjedt el a Buerger-féle precessziós goniométer, amely torzítatlanul képezte le a reciprokrácssíkokat. A szerves krisztallográfia kezdetének A. I. Kitajgorodszkij 1961-ben megjelent könyvét tekintjük.<sup>12</sup> Az egykristály-diffrakció robbanásszerű fejlődését hozta a 70-es években az ionizációs detektorral (szcintillációs számláló) felszerelt, számítógéppel vezérelt négykörös goniométer. A technika fejlődésével hetekre csökkent az egy diffrakciós mérésre és számolásra fordított idő. A 90-es évek végétől a térdetektoros (CCD vagy image plate) készülékek (5.1. ábra) megjelenése óta napok, akár egy nap is elegendő jó minőségű és méretű egykristály esetén a diffrakciós mérés és szerkezetmeghatározás elvégzésére.



5.1. ábra. A térdetektoros egykristály-diffraktométer felépítésének vázlatja és a Rigaku R-Axis Rapid II diffraktométer goniométere

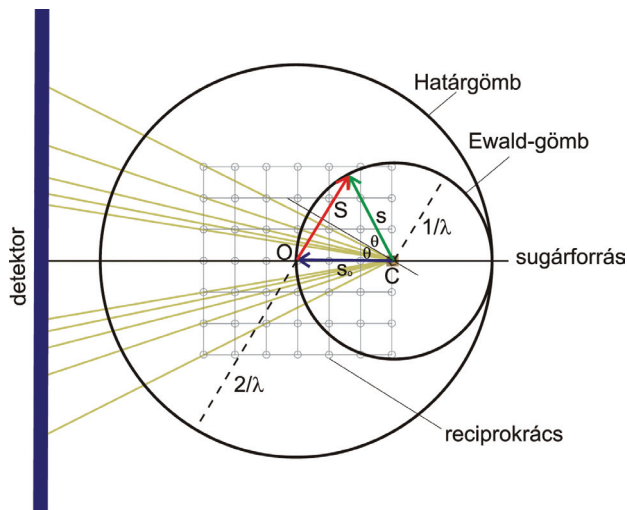
A molekulaszerkezet meghatározása a szórt hullámok rekombinációs számítása, amelyből egy időátlagolt elektronsűrűségi térképet kapunk. Az atomok rezgése a hőmérséklettől, a rácsbeli illeszkedéstől és a rendelkezésre álló helytől függ. Alacsony hőmérsékleten történő adatgyűjtéssel (cseppfolyós nitrogénnel vagy héliummal való hűtés), vagy nagynyomású kamra alkalmazásával az atomi hőmozgás csökkenthető, a rendezettség esetlegesen növelhető.



5.2. ábra. A diffrakciós kép a kristályrácsra, mint periodikus térrácsra reflektálódott diszkrét helyeken megjelenő különböző intenzitású interferenciamaximumokból áll

A diffrakciós képen (5.2. ábra) minden reflexió (visszaverődött sugárnyaláb) elhelyezkedése meghatározott, amely megfelel egy egyedi szórt sugárnak, amely megadott irányból érkezett a detektorra a kristály egy meghatározott síkjáról visszaverődve. A diffrakciós kép szimmetriája függ a kristályrács szimmetriájától, azaz a kristályrendszerétől és a tércsoporttól. A röntgendiffrakciós mérés során a kristály szimmetriájától függően elegendő a diffrakciós tér felének, negyedének vagy nyolcadának kimérése. A szimmetriák miatt bizonyos típusú reflexiók intenzitása azonos. A diffraktált sugár intenzitását az atomok szóróképessége és a cellában elfoglalt helye határozza meg. Az atomok szóróképessége arányos az elektronszámmal. Az elektronfelhő kiterjedtsége miatt nagyobb szögeknél a szóróképesség csökken. Az atomfajták szóróképességét az atomi szórástényező-függvények írják le, amelyeket kvantummechanikai eljárásokkal számítanak. Ezeket a formafaktorokat az International Tables for X-ray Crystallography (1962) III. kötetében adják meg.<sup>13</sup> A hőmérséklet növekedésével a szóróképesség csökken. A matematikai összefüggés a

Fourier- transzformáció, amely kapcsolatot teremt a méretéhez hasonló hullámhosszúságú sugárással leképzett háromdimenziós folytonos, periodikus atomrács és a diszkrét pontokból álló diffrakciós mintázat között (5.3. ábra). A diffrakciós mintázat a kristályrács Fourier-transzformáltja, a kristályrácsot pedig megkapjuk a diffrakciós mintázat inverz Fourier-transzformációjával. Ami a valós térben sík, az a diffrakciós, más néven reciprok térben pont és *vice versa*.



5.3. ábra. A röntgensugár szóródása a reciprokrácson. A kristály elforgatásával ott jelentkezik reflexió, ahol a reciprokrácspontok érintik az Ewald-gömb felszínét.

Nem hozhatók reflexiók helyzetbe a határgömbön kívüli reciprokrácspontok

Az elektronfelhőn szóródott sugárnyaláb teljes mennyisége az elektronsűrűség Fourier-transzformáltja:

$$G(S) = \int \rho(r) \exp[2\pi i r(s - s_0)] dr = \int \rho(r) \exp(2\pi i r S) dV, \quad (5.1)$$

ahol  $G(S) \equiv F(H)$  a szerkezeti tényező (struktúrfaktor),  $\rho(r)$  az elektronsűrűség,  $V$  az elemi cella térfogata. Méréskor a szórt hullám intenzitását detektáljuk, amely a komplex számként felírható  $G(S)$  függvény és annak a komplex konjugáltjával képzett szorzata:  $I = G(S)G^*(S)$ . A mért intenzitások négyzetgyökei az elektronsűrűségeloszlás Fourier-sorának Fourier-együtthatói:

$$\rho(r) = \int G(s) \exp(-2\pi i r S) dV, \quad (5.2)$$

azaz a  $G(S)$  szerkezeti tényező és a  $\rho(r)$  elektronsűrűség Fourier-transzformált párok. A  $V$  térfogatú elemi cellában lévő  $\rho(xyz)$  elektronsűrűségnek kitüntetett irányokban vett Fourier-transzformáltjai a

szerkezeti tényezők (más néven struktúrfaktorok),  $G(S) \equiv F(H)$ , abszolút értékük a szerkezeti amplitúdó:

$$\begin{aligned} F(H) = F(hkl) &= V \int_0^1 \int_0^1 \int_0^1 \rho(xyz) \exp[2\pi i(hx + ky + lz)] dx dy dz = \\ &= A(hkl) + iB(hkl) = A(H) + iB(H) = \\ &= F(hkl) \exp[i\varphi(hkl)] = F(H) \exp[i\varphi(H)], \end{aligned} \quad (5.3)$$

az intenzitás:

$$I(hkl) \propto F(hkl)F^*(hkl), \quad (5.4)$$

ahol  $x, y, z$  a frakcionális koordináták,  $h, k, l$  a Miller-indexek,  $\varphi(hkl)$  a fázisszög. A röntgendiffrakciós mérés során véges számú szerkezeti tényezőt kapunk, ezek Fourier-összegzése adja az elektronsűrűség-eloszlást:

$$\begin{aligned} \rho(xyz) &= \frac{1}{V} \sum_h \sum_k \sum_l F(hkl) \exp[-2\pi i(hx + ky + lz)] = \\ &= \frac{1}{V} \left\{ F(0) + 2 \sum_H [A(H) \cos 2\pi(H \cdot r) + B(H) \sin 2\pi(H \cdot r)] \right\}. \end{aligned} \quad (5.5)$$

Az elektronsűrűségi függvény normálalakja a szerkezeti amplitúdókkal és fázisszöggel felírva:

$$\rho(r) = \frac{1}{V} \left\{ F(0) + 2 \sum_H |F(H)| \cos[2\pi(H \cdot r) - \varphi(H)] \right\}. \quad (5.6)$$

A mért  $|F(hkl)|$  abszolút értékekből a fázisok hiányában a szerkezeti tényezők valós és képzetes részét nem tudjuk előállítani; a fázisszög:  $\varphi = \arctan[B(H)/A(H)]$ .

A szórt röntgensugár intenzitása arányos az amplitúdó négyzetével. A sugár a szóródása során elveszíti azt az információt, hogy milyen relatív fázissal szóródott. Ez a kristallográfiai fázisprobléma. A relatív fázisok meghatározásának több módszere ismert. A nehézatom-módszer (másnéven Patterson- vagy vektormódszer) akkor alkalmazható, ha a mintában nagy rendszámú atom található, mert ennek hozzájárulása a fázishoz meghatározó.<sup>1</sup> A direkt módszerek a fázisok *ab initio* meghatározását végzik (kémiai Nobel-díj, 1985, H. Hauptmann és J. Karle).<sup>14</sup> Előzetes szerkezeti információ nélkül, az összegképlet ismeretében fázisszettek generálunk. A fázisok között matematikai összefüggések vannak, de a rendszer túlhatározott. Az ún. „shake-and-bake” módszer felváltva számol a normál

és reciprok térben.<sup>15</sup> Az izomorf helyettesítés módszerével izostrukturális kristályok esetén számolhatunk, elsősorban makromolekuláknál alkalmaz-  
zák.<sup>16</sup> A „charge flipping” *ab initio* szerkezetmeghatározó módszer.<sup>17</sup> Az  
iteratív algoritmus lényege a kis elektronsűrűség folyamatos perturbációja,  
amely a fázistér feltérképezésével a szerkezet megoldásához vezet.

A véges számú mért és a számított szerkezeti tényezők eltérésének  
mértékét számoljuk a fázisszámítások konvergenciájának ellenőrzésére.  
Ám ez sohasem lesz nulla, mert egyrészt a mérésnek is van hibája,  
másképp az atomok nagyságuktól, pozíciójuktól, hőmérsékletüktől  
függően nyugalmi helyzetük körül mozognak (az atomi hőmozgás  
csökkenthető alacsony hőmérsékletű adatgyűjtéssel), valamint a kémiai  
kötésben részt vevő elektronok szórása sem elhanyagolható, és csak  
relatív intenzitásokat mérünk. A szerkezeti modell finomítása során  
a szerkezeti modellből számított  $F_c(hkl)$  értékek és a kísérleti  $F_o(hkl)$   
párjaik különbségét igyekszünk csökkenteni az intenzitásadatok legkisebb  
négyzetes illesztésével. A felállított modell eltérését a mért adatok által  
meghatározott szerkezettől jósági tényezőkkel jellemezzük ( $R$ ,  $R_w$ ,  $S$ ).

A mintára eső röntgensugárzás legnagyobb része áthalad a kristályon,  
kisebb részben elnyelődik, valamint diffraktálódik. Az abszorbeált sugár  
mennyisége függ a vizsgált minta anyagi minőségétől és az alkalmazott  
sugárzás hullámhosszától. Az abszorpciót korrigálni szükséges, ha a  
kristály erősen abszorbeáló atomokat tartalmaz (pl. fémkomplexek), és  
ha a kristály alakja jelentősen eltér az ideális gömbtől. A diffraktált sugár  
intenzitása azért is változik, mert a karakterisztikus sugárzás szóródás  
közben polarizálódik. A polarizáció  $\theta$  (Bragg-szög)-függő. A mért adatokat  
korrigálni szükséges még a Lorentz-féle sebesség- vagy időfaktorral,  
amely a reciprokrács pontjainak az Ewald-gömb felszínén való áthaladása,  
illetve tartózkodása közötti különbséget fejezi ki (5.3. ábra). Az extinkció,  
a diffraktált nyaláboknak a primer sugárral történő interferenciájából  
adódó intenzitáscsökkenés szintén korrekciót igényelhet.

A kristályban az atomok különböző mértékben mozognak el az  
egyensúlyi helyzetükből. Az anizotróp atomi rezgést az elmozdulási  
ellipszoidokkal modellezzük az egész kristályra átlagolva. A diffrakciós  
pillanatfelvétel egyidejűleg rögzíti az atomi rezgéseket és a kristályban  
fellépő atomi rendezetlenséget. Az atomi rendezetlenség lehet statikus  
vagy dinamikus, ill. ezek kombinációja. Az atomi rendezetlenség  
modellezésénél az elektronsűrűség-eloszlás leírása tört betöltöttségű atomi  
pozíciókkal történik. A statikus rendezetlenség esetében a rendezetlen, de  
gyakran másodlagos kölcsönhatásokkal megerősített atomi helyek között  
nagy potenciális energiagát van. A dinamikus rendezetlenség leginkább

hidrofób környezetben, másodlagos kölcsönhatások hiányában előálló mozgás, ebben az esetben az energiagát kicsi, a potenciálisenergiafüggvénynek széles minimuma van.

Az egykristály-diffrakció módszerével az abszolút konfiguráció meghatározható, ha a királis molekula jelentős anomális szórást mutató (oxigénnél nagyobb rendszámú) eleme(ke)t tartalmaz, és nem racém, hanem optikailag tiszta, királis tércsoportú kristályokat képez. Ha a röntgensugár hullámhossza egy atom abszorpciós élének közelében, ill. valamivel az alatt van, akkor a röntgensugár  $\pi/2$ -en túlmenően, de mindig pozitív fázisváltozást szenved. A Friedel-törvény, amely szerint a kristálytani sík két oldaláról a röntgensugár ugyanakkora intenzitással szóródik, anomálishan szóró atomok jelenlétében nem érvényes, a két intenzitás kimérhetően eltér. Az ún. Flack-x abszolút szerkezeti paraméter<sup>18</sup> finomítható.

Ahogy nőtt a megoldott szerkezetek száma, egyre több információ gyűlt össze a szerves és szerves kristálykémia, ill. a molekuláris biológia területén, ezért kialakultak az adatbankok.<sup>7</sup> A Cambridge-i Szerkezeti Adatbázis (CSD) ([www.ccdc.cam.ac.uk](http://www.ccdc.cam.ac.uk)) gyűjti a legalább egy C-H csoportot tartalmazó szerkezeteket. A 24 aminosavvegyésznél nagyobb polipeptidok és poliszacharidok a Protein Adatbankban (PDB) ([www.rcsb.org/pdb/](http://www.rcsb.org/pdb/)), az oligonukleotidok a Nukleinsav Adatbankban (NADB) ([www.ndbserver.rutgers.edu/](http://www.ndbserver.rutgers.edu/)) találhatóak. A szerves szerkezetek a Szerves Szerkezeti Adatbankba kerülnek ([www.fiz-informationsdienste.de/en/DB/icsd/](http://www.fiz-informationsdienste.de/en/DB/icsd/)), a fémeket és ötvözeteket a CRYSTMET® ([www.tothcanada.com/](http://www.tothcanada.com/)) adatbankban helyezik el.

A Cambridge-i Szerkezeti Adatbázis<sup>19</sup> (CSD) a szerves és fémorganikus vegyületek bibliográfiai, ill. kémiai adatait, továbbá röntgen- vagy neutrontdiffrakcióval meghatározott egykristály- vagy pordiffrakcióval kapott kristályszerkezeteit tartalmazza. Az adatbankban megtalálható szerkezetek száma a 2014. év végére meghaladta a 750.000-et. A CSD-t felhasználhatjuk a főbb molekuláris paraméterek és a fém-koordinációs-szféra geometriájának meghatározására. Modellkoordinátákkal szolgálhat a szerkezetfinomításához, a konformációs analízishez és a validáláshoz. A másodlagos kölcsönhatások tulajdonságait vizsgálhatjuk, a proteinligandum kölcsönhatásokat tanulmányozhatjuk. Az összegyűjtött szerkezeti adatokból következtethetünk a szerkezet és a reakcióút korrelációjára, felhasználhatjuk molekulamodellzésre a racionális gyógyszerhatóanyagtervezésben, és alapjául szolgálnak a tudatos kristálytervezésnek.

Az anyag fizikai-kémiai tulajdonságai egyrészt az azt felépítő alkotóelemek természetétől, másrészt az alkotóelemek közötti kölcsönhatásoktól függenek. A kristályokban előforduló nemkovalens kölcsönhatások: az erős és gyenge hidrogénkötés, a  $\pi\cdots\pi$  kölcsönhatás, a fémkoordináció, az elektrosztatikus és van der Waals-erők, a hidrofób hatások mind befolyásolják a kristályt felépítő molekulák illeszkedését, a molekuláris felismerési folyamatokat, zárványvegyületek stabilizálását, flexibilis molekula esetén a konformáció kialakulását, a biológiai makromolekulák aktivitását. A nemkovalens kölcsönhatások mind mélyebb megértése, a szupramolekuláris kémiai ismeretek teszik lehetővé, hogy egyre közelebb kerüljünk az áhított cél, a tudatos kristálytervezés (crystal engineering) felé. A gyenge kölcsönhatások irányította konformációs és szerkezeti sajátosságok befolyásolják a polimorfia jelenségének mint szupramolekuláris izomerizációnak a felléptét.

A kristályszerkezet kísérleti és számítástechnikai eszközökkel történő predikciós tanulmányozása nem szorítkozik a termodinamikailag legstabilabb szerkezeti módosulat keresésére, hanem hozzájárul a kristályosodási viselkedés komplexitásának, a polimorfia jelenségének megértéséhez is.<sup>20</sup> A molekulák kristályosodása termodinamikai és kinetikai faktorok összjátéka. A nukleáció és a különböző kristályosítási körülmények, mint: hőmérséklet, nyomás, oldószer, szennyezés, felületek stb. szerepének sokkal mélyebb megértésére van szükség a különböző szilárd formák kialakulásának irányításához, mielőtt egy kívánt kristályforma rutinszerű tervezését meg tudnánk tenni.

## 5.3. Szerves kristályok polimorfája

### 5.3.1. Történeti áttekintés

A polimorfia jelenségét először Mitscherlich írta le (1821). Felismerte, hogy a kalcit és az aragonit azonos kémiai összetétel mellett ( $\text{CaCO}_3$ ) fizikai tulajdonságaikban különböznek. Megállapítja, hogy „ugyanannyi azonos elem különböző módon rendeződhet, s ennek eredménye az, hogy formájuk és fizikai tulajdonságaik különböznek.” A XX. század hatvanas éve óta a polimorfia jelensége folyamatosan az érdeklődés középpontjában áll. Egyre gyakrabban észlelik elsősorban a gyógyszeriparban, így a kristályos anyagot tartalmazó szilárd gyógyszerek, a szuszpenziók, továbbá a krémek esetében is. A robbanóanyagok területén is meghatározó szerepe van. Ezért az alapvető vizsgálatokon túl fontos kérdés annak



tisztázása, hogy a módosulatváltozás váratlan fellépése milyen kárt okoz szilárd gyógyszerekben, szuszpenziókban, avagy a robbanószerek kezelhetőségében.<sup>21-26</sup>

McCrone szerint<sup>21</sup> polimorfia az, amikor a komponens molekulák oldatban azonos szerkezetűek, függetlenül attól, hogy melyik szilárd módosulattól nyerték az oldatot. Szerinte elvileg minden anyag mutathat polimorfiát, ha elegendően hosszú időn át próbálkozunk az előállításával. Bár ez nem teljesen igaz, de azok a kutatók, akik szerves molekulák kristályaival dolgoznak, nem felejthetik Kuhnert-Brandstätter és Glasser figyelmeztetését:<sup>22</sup> „A polimorfia vizsgálata sohasem tekinthető teljesen kimerítettnek, mindig van lehetőség arra, hogy speciális oltóanyag hatására egy addig ismeretlen forma jelentkezik”. Elfogadott nézet szerint a molekulatársulások változatosságának oka az a törekvés, hogy szoros illeszkedésük (*close packing*) minél nagyobb legyen (kb. 75%) azáltal, hogy a szabálytalan alakú molekulák kidudorodásai (*bumps*) jól illeszkednek a szomszédos molekulák üregeibe, felhasználva a hét kristályrendszer által biztosított szimmetriaműveleteket. Szobahőmérsékleten, légköri nyomáson termodinamikailag csak egy polimorf lehet stabil, a többi csak metastabil. Tehát csak egy módosulat érheti el a legszorosabb illeszkedést a rácsban, a többi csupán részlegesen szoros illeszkedésű. Ebből következik, hogy adott hőmérsékleten a legnagyobb sűrűséget a stabil forma veszi fel. Azonban ez sem szükségszerűen igaz. Például a 4,4-difenil-2,5-ciklohexadienon (**1**) négy kristályos formát mutat, amelyben 19 krisztallográfiaiilag független molekulakonformációt különböztettek meg.<sup>27</sup>

Mindezekből következik, hogy a kristályszerkezetek megjósolása egyelőre még nem tekinthető megoldottnak, bár nem lehetetlen.<sup>28</sup> Jelen fejezet ebből indul ki. A polimorfia néhány tipikus és különleges esetének ismertetése után megkíséreljük jellemezni az ellentétes jelenséget: az izostrukturalitást. Gyakori, hogy a polimorfia az izostrukturalitás valamilyen fokának megőrzésével alakul ki, továbbá a két jelenség közös vonása lehet a morfortrópia fellépése.

### 5.3.2. A polimorfia gyakori és ritka formái

A molekulavegyületek kristályos állapotban mutatott polimorfjai a homomolekuláris fázisok szupramolekuláris izomerjeinek tekinthetők. A molekulák heteromolekuláris rendszereket alkotva gyakran társulhatnak vendégmolekulákkal, oldószerekkel vagy kokristályképzőkkel. A homomolekuláris kristályok és molekulatársulásaik (szolvátok, hidrátok)



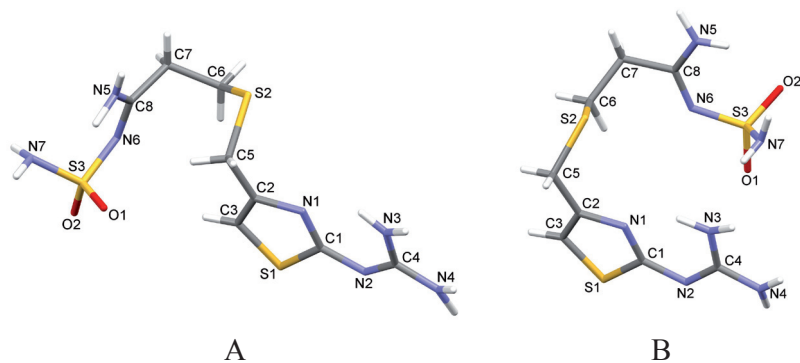
viszonyát gyakran, ámbár hibásan, pszeudopolimorfának nevezik.<sup>22</sup> Halebian és McCrone<sup>23</sup> már jó ideje óvnak attól, hogy a kényelmesnek látszó pszeudopolimorfia elnevezéssel a heteromolekuláris társulásokat egyszerűen összekeverjék a polimorfiaival. Ezt az immár klasszikus figyelmeztetést sokan támogatják, többek között Threlfall<sup>24</sup> és Bernstein.<sup>25</sup> A zűrzavar csökkentése érdekében Bernstein<sup>26</sup> ajánlotta a szolvátok és hidrátok elnevezést. Az utóbbi években gyorsan terjed a szolvatomorfia elnevezés.

Mind a homo-, mind a heteromolekuláris fázisok polimorfjai rendszerint spektroszkópiái (IR, Raman, szilárd NMR) és más fizikokémiai módszerekkel (DSC stb.) megkülönböztethetők. Mélyebb különbségtételt azonban csak egykristályok röntgendiffrakciós vizsgálatával érhetünk el. Ennek egyetlen akadálya az egykristályok növesztése lehet. Gyakori korlát, hogy csak az egyik forma állítható elő kristályos formában, ugyanakkor előrelépés várható a porformából történő röntgendiffrakciós szerkezetmeghatározások gyors fejlődésével. Az intermolekuláris kapcsolatok megvilágítása, különösen a szupramolekuláris szintenok<sup>29,30</sup> segíthetnek a legvalószínűbb molekulatársulások megjelölésében, amelyeket különböző feltételek mellett oldatból nyerhetnek. Így egy módosulat beoltása egy másikkal együtt fellépő polimorfia kialakulását eredményezheti.<sup>31</sup> Ismereteink a szupramolekuláris jelenségek tulajdonságait illetően még ma is korlátozottak.

### 5.3.3. Konformációs polimorfia

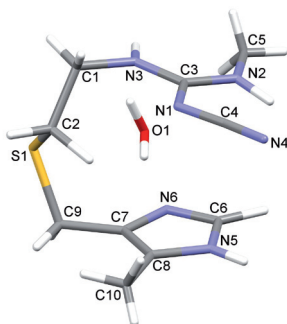
A polimorfia legismertebb formái a molekulák flexibilitásának köszönhetőek. Amikor a molekulák belső rotációja nem gátolt, hidrogénhídonorok és -akceptorok jelenlétében, a kristályosítás körülményeitől (oldat különböző komponensekkel különböző koncentrációban, változtatott nyomás és hőmérséklet, illetve hűtés-melegítés stb.) függően különböző polimorfok képződhetnek. A korai jóslatokra<sup>22,23</sup> utalva a molekuláris hajlékonyság (flexibilitás) növekedésével, a kristályosítás során mutatott türelemtől függően, ilyen molekulák számos polimorf állapotot mutathatnak. Ilyen például a hatékony hisztamin H<sub>2</sub>-receptor antagonistá, a cimetidin (**2**), amely a hajlékony -CH<sub>2</sub>-S-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-tioéterhídjával öt ismert és két pontosan nem jellemzett módosulatot formál.<sup>32</sup> Viszont a rokon famotidin (**3**) – azonos tioéter híddal, de más végcsoporttal – csupán két módosulatot (A és B) képez,<sup>33</sup> és újabb

módosulatok előállítására számos próbálkozás ellenére eredménytelen maradt.<sup>34</sup> Az A forma képződését termodinamikai tényezők kontrollálják, a kinetikus kontroll alatt álló B polimorf pedig telített vizes oldat gyors hűtésével nyerhető. A kinetikusan preferált B forma kisebb konformációs energiával bír, mint az A, és „hajtű” alakú molekulákból épül fel (5.4. ábra).



5.4. ábra. A famotidin (3) termodinamikailag (A), illetve kinetikailag kedvezményezett hajtű alakú (B) konformációja

Hasonló módon a cimetidín·H<sub>2</sub>O<sup>35</sup> (5.5. ábra) és az analóg [3-amino-4-[[2-[[[5-(dimetilamino)metil]-2-furanil]metil]tio]etil]amino]-1,2,5-tiadiazol-1-oxid (4),<sup>36</sup> a közös CH<sub>2</sub>-S-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>- híd megfelelő belső forgásának eredményeképpen, ugyancsak hajtű alakot vesz fel.



5.5. ábra. A cimetidín (2) hajtű alakú konformációja a monohidrát formában

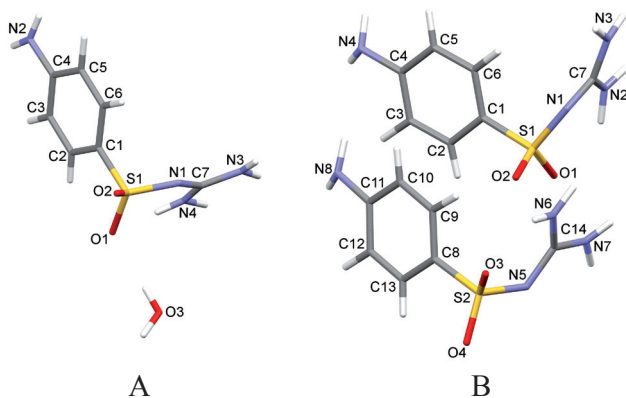
Kérdésként vetődik fel, hogy a három molekulaszervezet által felvett hajtű alakzat pusztán véletlen-e vagy sem. A válasz<sup>37-41</sup> egyelőre várat magára.

### 5.3.4. Síkmolekulák polimorfája

A konformációs szabadság alapvetően különböző szoros illeszkedéshez vezethet, de a polimorfia oka más is lehet. Az akirális nitrofurantoin (**5**) sík molekulája pl. két vízmentes formában kristályosodik,<sup>42</sup> amelyeket forró ecetsav-víz keverékéből ( **$\alpha$ -5**), illetve forró acetontól ( **$\beta$ -5**) nyertek. Forró víz-aceton keverékéből viszont két monohidrátot kaptak.<sup>43</sup> A hidrátok képződése az **5**:H<sub>2</sub>O arányától függ a keverékben; 2:1 arány esetén az (**I-5**), 1:1 arány esetén a (**II-5**) formát kapjuk. Ezen túlmenően a nitrofurantoin szolvátot képez<sup>44</sup> DMF-fel (**III-5**) és DMSO-val (**IV-5**) is. A nitrofurantoin molekulák konformációja sem a hidrátokban, sem a szolvátokban nem mutat eltérést a síkformától. Homo-, illetve heteromolekuláris társulásai viszont jól demonstrálják a pszeudopolimorfia elnevezés tarthatatlanságát. A vízmentes formák valódi polimorfok, ugyanígy egymás között a monohidrát formáik is. Az utóbbiakat célszerű szolvatomorfoknak nevezni.

### 5.3.5. Szupramolekuláris hatások molekulakonformációkra

A polimorfia szupramolekuláris jelenségként való értelmezése az utolsó harminc évben sokat fejlődött. Példaként szolgáljon a szulfaguanidin (**6**), amely ambiens körülmények között monohidrátként (5.6.A ábra) mutat stabil molekulatársulást.<sup>45</sup> A monohidrát szerkezetben a víz három hidrogénhid képzésével három, szimmetria kapcsolta (**6**) molekula között képez hálózatot. Ezt az etalonként is tekinthető szoros illeszkedést 1981-ben váratlanul sikerült egy vízmentes formával meghaladni.<sup>46</sup> 18-Korona-6-éter vizes oldatából a szulfaguanidin (**6**) vízmentes formában kristályosítható. Továbbra is monoklin rendszer mellett (tércsoport  $P2_1/c$ , 14), az aszimmetrikus egységben két molekula társul (5.6.B ábra). A molekulák S(VI)-C<sub>ph</sub> kötése körüli elfordulás 82° eltérést mutat, egyikük (**6A**) az *N*-szubsztituált arilszulfonamidokra jellemző, energetikailag kedvező konformációt, a másik (**6B**) közel merőleges fenilsíkkal, a legkevésbé kedvező formát veszi fel. A jelenség kézenfekvő értelmezése, hogy a szoros illeszkedés dominanciája felülírhatja az intramolekuláris viselkedést. Oldatban a nagy térigényű (*bulky*) koronaéter-molekulák megakadályozzák a szulfaguanidin és a víz közvetlen kapcsolatát. Következésképpen a konformáció különbsége a (**6A**) és (**6B**) molekulák között új erős hidrogénhidak képződését eredményezi. Vizek nélkül nyolc intermolekuláris hidrogénhid képződik, s ezekből öt kapcsolja össze a



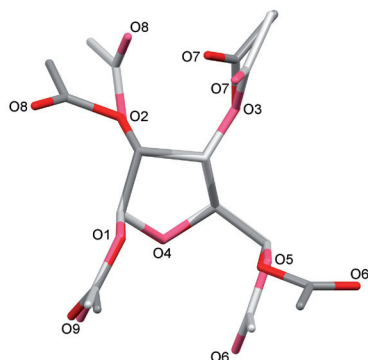
5.6. ábra. A szulfaguanidin (6) monohidrát (A) és vízmentes (B) formája (két molekula I és II az aszimmetrikus egységben). A szimmetriafüggetlen I és II molekula konformációja látványosan különbözik az S(VI)-fenil kötés körüli elfordulásban

szimmetriafüggetlen molekulákat. Ezzel szemben a monohidrátban a potenciálisan donorként számbavehető nyolc hidrogénatomból csak négy képez hidrogénhidakat, amelyek közül a 4-amino csoport ki van rekesztve. A koronaéter-kontrollálta szulfaguanidinkristályosodás eredménye két, konformációban különböző molekula az aszimmetrikus egységben, amit viszonylag nagy sűrűség ( $D_c = 1,56 \text{ g/cm}^3$ ) kísér.<sup>47</sup>

### 5.3.6. Eltűnő, majd visszatérő polimorfia

Az 1,2,3,5-tetraacetyl- $\beta$ -D-ribofuranóz (7) eltűnő (1954), majd visszatérő (1981) alacsony olvadáspontú monoklin formája (AO), valamint monotróp fázisátalakulással kialakuló magasabb olvadáspontú (358 K) rombos alakja (MO) a kristályokban észlelt szupramolekuláris jelenségek figyelemreméltó esete.<sup>48-51</sup> Először 1947-ben írták le az AO képződését 1,2,3-triacetyl-5-trityl-D-ribofuranózból. A tisztított szirup állás után 331 K olvadásponttal kristályosodott ( $[\alpha]_D^{15} = 20^\circ$ ). 1948-ban némileg változtatott technikával előállítását megismételték. 1950-ben viszont D-ribózt piridinben ecetsav anhidriddel regáltatva, kénsav, majd KOH alkalmazásával kapott szárított nyersterméket metanolból kristályosították át. A kristályok olvadáspontja 358 K-re emelkedett ( $[\alpha]_D^{23} = -15,4^\circ$ ). A két forma reprodukálásának sorozatos megisméltése<sup>48</sup> után a szerzők egyike, Wisser metanolban kimérte MO katalitikus hatását a polarimétercsőben tartott AO-ra. Amint egy igen kis mennyiségű MO-t adott a csőben lévő

AO formához, az optikai forgatóképesség változni kezdett, végül néhány óra után elérte az  $[\alpha]_D^{23^\circ} = -15,4^\circ$  értéket. Erre figyelt fel Patterson és Groshens,<sup>49</sup> akik az AO fázist  $P2_1$  tércsoport (4) mellett monoklinnak, az MO fázist pedig a  $P2_12_12_1$  tércsoporttal (19) rombosnak találták. Az elemicella-meghatározások és a közvetlen fázisátalakulás tesztelése után az AO további létezését az MO megszüntette. A *Nature* c. folyóiratban leírtak után (1954) már csak MO kristályszerkezetének meghatározása volt lehetséges.<sup>50,51</sup>



5.7. ábra. Az 1,2,3,5-tetraacetyl- $\beta$ -D-ribofuranóz (7) metastabil, alacsony olvadáspontú (AO, sötét árnyalattal), és stabil, magas olvadáspontú (MO, halvány árnyalattal) dimorfjában felvett konformációjának szuperpozíciója

Az eltűnt AO kristályokat 1981-ben (az MTA KKKI-ban) metanolból kristályosítva, centiméteres nagyságban ismét sikerült előállítani. A röntgendiffrakciós szerkezetmeghatározás felfedte, hogy a konformáció a két módosulatban alig különbözik, szuperpozíciójukat az 5.7. ábra mutatja. Az intermolekuláris kapcsolatok vizsgálata viszont AO kristályrácsában néhány szokatlanul rövid H $\cdots$ H távolságot derített fel, ezek az MO rácsából hiányoznak. Az újra megjelent AO fázis létét és szerkezetének közlését<sup>52</sup> számos értekezés idézte, többek között Dunitz és Bernstein.<sup>53</sup> Mivel a jól fejlett kristályok fiolába zárva 22 évig változás nélkül maradtak, neutrondiffrakcióval (25 K, Studsvik, Svédország) kiegészített új vizsgálatokat végeztünk.<sup>54</sup> Kitűnt, hogy ugyanazon hőmérsékleten az MO egy molekulára eső elemicella-térfogata valamivel nagyobb, mint a metastabil AO esetében. A stabil forma tehát a magasabb szimmetriájú tércsoportban kisebb sűrűséggel formál kristályt, mint a metastabil polimorf [az illeszkedési együttható,  $pc = 0,73$  (AO), illetve  $0,71$  (MO)]. A szorosabb molekulailleszkedést mutató polimorf szabadenergiája kisebb,<sup>55</sup> mint a másiké, ami a szoros illeszkedés szabályainak korlátozott érvényességére utal. Ezen túlmenően az AO dimorfban a szerves

molekulák kristályszerkezetében eddig talált legrövidebb H...H távolságot (1,949 Å) észleltük, ami a többi, ugyancsak rövid H...H kapcsolattal együtt feltehetően hatással van az észlelt monotróp fázisátalakulásra.

## 5.4. Szerves kristályok izostrukturalitása

### 5.4.1. Kristályizomorfia

Ha a polimorfíát szupramolekuláris divergenciának tekintjük, az ellentétes jelenséget, az izostrukturalitást, szupramolekuláris konvergenciának nevezhetjük. A két jelenség bizonyos feltételek mellett kölcsönhatásban áll egymással. A polimorfia, amint arra már utaltunk, esetenként dimenziójában korlátozott (1D, 2D) izostrukturalitást is megőriz. Kapcsolatukra a figyelmünket Bernstein és munkatársai által<sup>56</sup> közölt *para*-diszubsztituált benzilidénanilinek rokon szerkezetének egybevetése<sup>57</sup> irányította. Azóta számos kristályos rendszert írtak le, amelyeket a polimorfia és az izostrukturalitás kapcsolata jellemez. Így Kobayashi vendégmolekulákat váltogatva (aceton, benzol, dioxán, DMF, DMSO, EtOH) kondenzált tiofénkomplexek izostrukturalitását, illetve polimorf transzformációit közölte.<sup>58</sup>

A jelenségről elsőként 1772-ben Jean Baptiste Louis Romé de L'Isle tudósított. Megfigyelte, hogy timsókristályt telített ammónium-timsó oldatába helyezve az növekedni kezdett, és ammónium-timsó réteg vont be. 1809-ben Wollaston felismerte, hogy a kalcit, a magnezit és a sziderit ( $\text{CaCO}_3$ ,  $\text{MgCO}_3$ ,  $\text{FeCO}_3$ ) kissé eltérő méretű síkokkal határolva, romboédes kristályok alakjában kristályosodnak. 1819-ben Mitscherlich megállapította, hogy bizonyos sópárok, mint a  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{KH}_2\text{AsO}_4$ ,  $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$  és  $\text{NH}_4\text{H}_2\text{AsO}_4$  hasonló kémiai összetétel mellett azonos kristályformákban növekszenek. A különbség egy atom cseréje egy másikkal. Ezeket a párokat izomorfoknak nevezte el. Hamarosan közismertté vált, hogy az izomorfia fontos szerepet játszhat a kémiában. Mitscherlich tanára, Berzelius a szelén atomsúlyát a  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ,  $\text{Ag}_2\text{SO}_4$ ,  $\text{Na}_2\text{SeO}_4$  és a  $\text{Ag}_2\text{SeO}_4$  izomorfíája alapján határozta meg. A jelenség morfológiai jellemzését Groth (1874) írta le. A röntgendiffrakció korai eredményei alapján Náray-Szabó István ismerte fel<sup>59</sup> különböző sztöchiometriájú kristályok testvérszerkezetét.

A különböző műhelyek az izomorfia kritériumaként a kristályok közös alakja mellett az egymás oldatában történő növekedést fogadják el. Az izomorfia pontosabb definícióját keresve Wells<sup>60</sup> és Bloss<sup>61</sup> bevezette

az izostrukturális és az izostrukturalitás (vagy izotípiá) elnevezést. Az elnevezések ellentmondása készítette a Nemzetközi Krisztallográfiai Uniót,<sup>62</sup> hogy szervesen vegyületek hasonlósága esetében kizárólag az izotípiá, illetve a homeotípiá elnevezést tartsa kívánatosnak. Ami a szerves kristályokat illeti, Kitajgorodszkij alapvető munkájában<sup>12</sup> azon idők (1955-1960) ismeretei alapján egyszerűen az elavult izomorfiá elnevezést használta. Kitajgorodszkij korai megállapításaiból kiindulva a jelenség ismertetése során rámutattunk,<sup>63</sup> hogy a szerves kristályok esetében az izomorfiá elnevezés elégtelen, sőt esetenként hibásnak is tekinthető. Ugyanis két, szerkezeti rokonságot mutató kristály magasfokú izostrukturalitást mutathat a klasszikus értelemben vett azonosalakúság, azaz izomorfiá nélkül is. De fordítva is igaz,<sup>64</sup> olyan rokon molekulapár szerkezetét is leírtuk, ahol az elemi cella és szimmetriá hasonlósága ellenére a molekulák szoros illeszkedése alapvetően különböző.

#### 5.4.2. Az izostrukturalitás jellemzői

A digirezigenin (3 $\beta$ -hidroxí-14,15 $\beta$ -epoxí-5 $\beta$ ,14 $\beta$ -kard-20,22-enolid)<sup>65</sup> és a digitoxigenin<sup>66</sup> elemi cellájának és térszerkezetének hasonlósága irányította a figyelmet a kardenolidok ( $\gamma$ -laktonok) és bufadienolidok ( $\delta$ -laktonok) morfológiai és szerkezeti hasonlóságára. Mivel a kardiotóniás szteroidok közös 14-izoetiokolán váza különböző szubsztituenseket hordoz, hasonlóságukat „fő-rész” izostrukturalitásnak neveztük el. Három hasonlósági indexet vezettünk be: a cellahasonlósági és az izostrukturalitási indexek mellett még a molekuláris izometricitási indexet.<sup>67,68</sup> Azonos tércsoport és felismerhető szoros illeszkedés mellett ezen indexek alkalmazásával számos molekulacsoport esetében ismertük fel az izostrukturalitás jelenségét. A szerkezeti hasonlóságok fő típusait<sup>57</sup> nagy- és kífokú izostrukturalitással jellemeztük. Az izostrukturalitás alacsony fokát mutató kristályokat homostruktúráknak neveztük, majd tisztáztuk az izostrukturalitás feltételeit és korlátait.<sup>69,70</sup> Probléma maradt a molekulatársulásoknál, így az 5-metoxiszulfatiazin kloroformmal, tetrahidrofuránnal és 1,4-dioxánnal alkotott kristályainál<sup>71</sup> az izostrukturalitás fokának mérése. Bár a gazdamolekula azonos, a vendégmolekulák eltérő alakja miatt izostrukturalitás számítás nem volt végezhető. A kiértékelés még nehezebb, ha izometricitásukban a gazdamolekulák is mutatnak különbségeket, mint a különböző fenollokkal együttkristályosított tubuláns diolok.<sup>72</sup> A heteromolekuláris kristályok homostrukturalitása a térfogathasonlósági index bevezetésével vált számíthatóvá.<sup>73</sup>



### 5.4.3. Az izostrukturalitás számítása

#### 5.4.3.1. Az elemi cella hasonlósági indexe

Az izostrukturalitás felismerésének egyik alapfeltétele az elemi cellák hasonlósági indexének a számítása:

$$II = [(a+b+c)/(a'+b'+c')] - 1, \quad (5.7)$$

ahol  $a$ ,  $b$  és  $c$ , valamint  $a'$ ,  $b'$  és  $c'$  a két rokon kristály ortogonalizált elemicella-paramétere. Azonos elemi cellákra  $II = 0$ . Mivel  $II$  függ az ortogonalizálástól (különösen triklin kristályok esetén), a megfelelő elemi cella összehasonlítás érdekében Löwdin<sup>74</sup> ortogonalizálási módszerét adaptáltuk.

#### 5.4.3.2. A molekulák pozíciójának összehasonlítása az elemi cellában

Az izostrukturalitási  $[I_i(n)]$  és molekuláris izometricitási  $[I_i(n)^*]$  indexek számításához az alábbi algoritmust vezettük be:<sup>57</sup>

$$I_i(n) = \left[ \left[ \frac{\sum (\Delta R_i)^2}{n} \right]^{1/2} - 1 \right] \times 100, \quad (5.8)$$

ahol  $n$  két összehasonlított (A és B) kristály azonos aszimmetrikus egységében (az elemi cella azon legkisebb része, amelyben szimmetria már nem található) kijelölt azonos, nemhidrogén atomok koordinátáiból számított távolságkülönbségek ( $\Delta R_i$ ) száma. Megjegyzendő, hogy  $I_i(n)$  figyelembe veszi mind a molekulák geometriai (konformációs), mind helyzetük forgási és csúsztatási (transzlációs) különbségét. Ezzel ellentétben az azonos atomok ( $i_A$  és  $i_B$ ) helyzetének teljes, illetve részleges fittelése a legkisebb négyzetek módszerével a molekulák különböző lehetséges szuperpozícióját eredményezi. Mikor ezeket az illetett  $\Delta R_i^*$  értékeket használjuk az (5.8) egyenletben, az új indexet  $[I_i(n)^*]$  mint a molekula izometricitási indexét tudjuk értelmezni. Ez közvetlen mércéje a molekulák megközelítő izomorfiájának.<sup>12</sup> Mivel a hidrogénpozíciókat kevésbé pontosan lehet lokalizálni, mint a nehéz atomokat, a számításból kimaradnak. Természetesen esetenként  $I_i(n)$  korlátozódhat az atomok különböző csoportjaira. Összességében az  $I_i(n)$  és  $I_i(n)^*$  számítása lehetővé teszi, hogy kristályos állapotban felismerjük a markáns különbségeket a molekulák izometricitása és izostrukturalitása között.<sup>57</sup>



Az izostrukturalitás-számítások elterjedésével a kitágult és összehúzó-  
dott elemi cellák szuperpozíciójából eredő hibák javítást kívántak.

### 5.4.3.3. Az izostrukturalitás térfogati indexe

Az új egyenlettel az atomi koordináták helyett az azonos csoportok által  
az elemi cellában elfoglalt térfogatot hasonlítjuk össze:

$$I_v = 2V_{\cap} / (V_1 + V_2) \times 100\% , \quad (5.9)$$

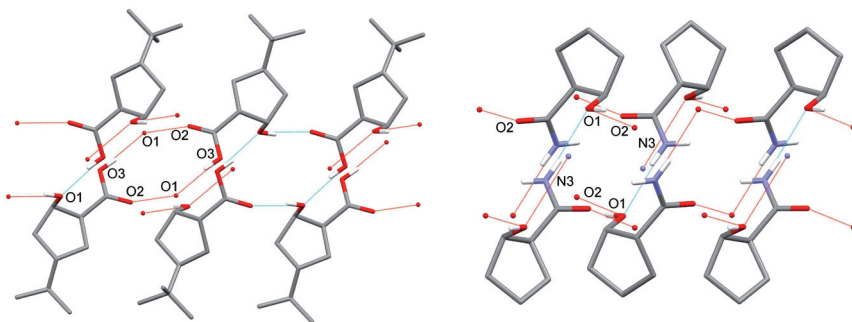
ahol  $V_1$  és  $V_2$  az összehasonlított fragmensek térfogata, míg ezek  
átfedésének térfogata  $V_{\cap}$ . Az  $I_1(n)$  indextől eltérően  $I_v$ -t az egész elemi  
cellára számítjuk. Nagysága azonos szerkezetekre lehet 100%, vagy  
ha az összehasonlított csoportok (molekulák) egyáltalán nincsenek  
átfedésben, 0%.

### 5.4.4. Az izostrukturalitást építő és gátló tényezők

A molekulakristályok között fellépő izostrukturalitás bizonyított  
eseteinek növekvő száma<sup>75</sup> hozzájárul a jelenség okainak feltárásához.  
A jobb érthetőség céljából a homomolekuláris és a heteromolekuláris  
rendszereket külön tárgyaljuk.

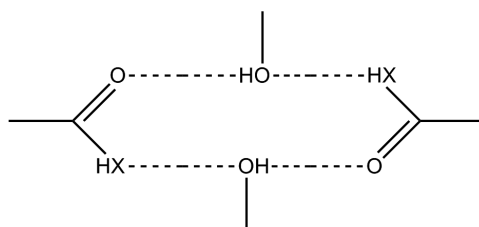
#### 5.4.4.1. A molekulák mérete

Kitajgorodszkij szerint<sup>12</sup> kis molekulák nem mutathatnak  
izostrukturalitást. Ezt példázza a difenildiaciloxispiroszulfurán (**8a**) és  
szelén analógja (**8b**). Bár mindkét kristályszerkezetben a molekulák  
kétfogású tengelyen (digír) ülnek, szoros illeszkedésük különböző,<sup>63</sup>  
tércsoportjuk rombos  $Fdd2$  (43), illetve monoklin  $C2/c$  (15). A nagyobb  
átmérőjű szelénatom „kinyomódik” a pillangó alakú molekulából, így  
részt vesz egy intermolekuláris Se...O kötés kialakításában, ami (**8a**)-ból  
hiányzik. Homostrukturalitás észlelhető azonban olyan esetekben, amikor  
a molekuláris térfogatváltozást a funkciós csoportok változása is kíséri.<sup>76</sup>  
A monoklin ( $1R^*, 2S^*, 4S^*$ )-4-*terc*-butil-2-hidroxiciklopentán-1-karbonsav  
(**9a**) és *terc*-butil-csoport mentes *cisz*-karboxamid analógja (**c-10b**), bár  
az utóbbi molekula *terc*-butil-csoport nélküli térfogata (**9a**)-nál 33,5%-al  
kisebb, szoros illeszkedésük hasonló marad (5.8.a és 5.8.b ábra), ami az  
alábbi tetramer alakú szupramolekuláris szintonnak köszönhető.<sup>77</sup>



5.8. ábra. Az (1*R*\*,2*S*\*,4*S*\*)-4-*tert*-butil-2-hidroxiciklopentán-1-karbonsav (**9a**) és a *tert*-butil-csoport mentes karboxamid (**c-10b**) analógjának hasonló szoros illeszkedése

Ebben az OH → NH<sub>2</sub> csere a szoros illeszkedést nem zavarja meg (kooperatív effektus). Bár az elemi cella jelentős összehúzódása kíséri [*V* = 1035,3(4) Å<sup>3</sup> → 648,6(2) Å<sup>3</sup>], (**9a**) irányított hidrogénhíd-hálózata túléli a nagy kiterjedésű *tert*-butil-csoport eltávolítását.



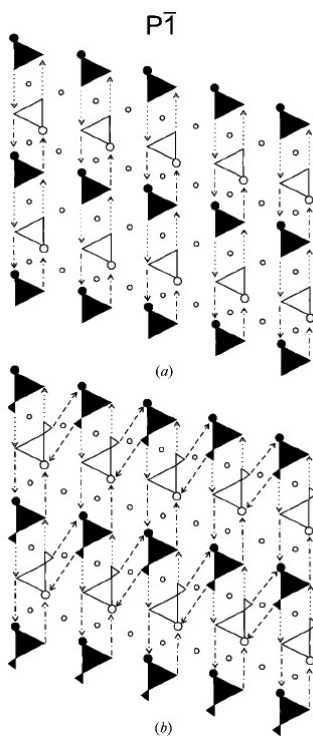
**9a**: X = O, **10b**: X = NH

Egy további szupramolekuláris O=C-N-H...O=C-N-H szinten<sup>78</sup> jelenléte, ami a belépő NH<sub>2</sub>-csoporttal épül fel, sem változtat a molekulák hasonló térkitöltésén.

#### 5.4.4.2. Kooperatív szubsztituensek

Kooperatív effektust mutat a *transz*-2-hidroxiciklooktán-1-karbonsav (**t-10g**) -OH csoportjának -NH<sub>2</sub> csoporttal való helyettesítése (**t-10h**) is.<sup>79</sup> Szerkezetük hasonlósága megjósolható volt kétdimenziós szimbolikus ábrázolásuk segítségével (5.9. ábra). Természetesen az OH → NH<sub>2</sub> helyettesítés részletei a 2D-szkémákból csak részben érthetők. Ugyanis a sík és a meghajlított (S-alakú) dimerek nem különböztethetők meg. Csak a térszerkezetből (5.10.A ábra) látható, hogy a sík alakú O-H...O(H)

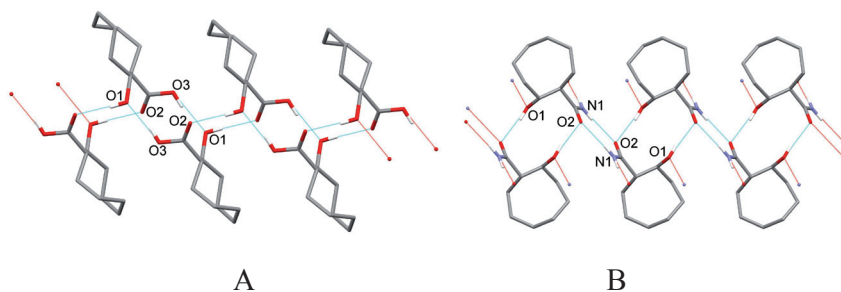
(továbbiakban ‘OH’) dimereket a hajlított O-H···O=C (továbbiakban ‘OC’) dimerek rendezik végtelen szalagokká (**t-10g**).



5.9. ábra. A (**t-10g**) és a (**t-10h**) szoros illeszkedésének topologikus ábrázolása a triklin elemi cella  $ab$  síkjára merőlegesen. Az aliciklikus gyűrűk elhagyása után az enantiomereket fehér és fekete háromszögek különböztetik meg. A háromszögek csúcsa az -OH, míg a kis körök a =CO csoportokat jelölik. A (**t-10h**)-ban az aminos csoportot kis háromszögek, a háromféle nyilak, párosan, a különböző hidrogénhidakat jelölik

A planáris ‘OH’ dimerek szimmetria centruma  $\bar{1}$   $y = \frac{1}{2}$  értékhez kötött, és ezek a hajlított ‘OC’ dimerek felépítésével (5.10.B ábra) az  $(a + c)/2$  átló mentén szerveződnek tovább. Ezt a dimer hálózatot (**t-10h**)-ban az OH  $\rightarrow$  NH<sub>2</sub> csere, az OH···O=C hidrogénhid fennmaradása mellett, a két új -NH<sub>2</sub> hidrogén segítségével átalakítja. A ciklooktángyűrű -OH csoportjával és az új -CONH<sub>2</sub> csoport oxigénjével képeznek hidrogénhidat, majd páronként ismét dimereket formálnak. A sík dimereket most az N-H···O=C, míg a hajlított dimereket az N-H···O(H) H-híd páros tartja össze. Az átrendeződést túlélő OH···O=C hidak az N-H···O(H) hidakkal kooperálva, antiparallel irányítottsággal, két [O(H)···O=C-N-H]<sub>x</sub> egységekből álló

végtelen molekulaláncot formálnak. Az OH  $\rightarrow$  NH<sub>2</sub> cserét (5.10.a ábra) a ciklooktángyűrű közelsége gátolja. Ez a sztérikus gát azonban a -CONH<sub>2</sub> csoportok ca. 180°-os elfordulásával és az *a* tengely megnyúlásával (0,725 Å) minimumra csökken, az elemi cella térfogata pedig 45,7(1) Å<sup>3</sup>-mel növekszik. Végeredményben a hidrogénhidak donor- és akceptor-funkciójának változása mellett (**t-10g**) és (**t-10h**) a triklin *P* $\bar{1}$  (2) tércsoportban homostrukturális (*I*<sub>v</sub> = 60%) marad.



5.10. ábra. A *transz*-2-hidroxiciklooktán-1-karbonsav (**t-10g**) és a karboxamid (**t-10h**) származék izostrukturalitása

A hidrogénhidak számának változása nem szükségképpen akadályozza a rokon vegyületek izostrukturalitását. Ezt mutatja az 1-metil-5-nitro-2-fenilimidazol és a 2-(*p*-amino-fenil)-1-metil-5-nitro-imidazol H  $\rightarrow$  NH<sub>2</sub> helyettesítése.<sup>80</sup> Bár a származékban két új hidrogénhid is található, amelyeket az -NH<sub>2</sub> képez az -NO<sub>2</sub> csoporttal, a belépő -NH<sub>2</sub> funkciók helyfoglalása csak az aszimmetrikus egység térfogatának kis növekedését ( $\Delta V = 13 \text{ \AA}^3$ ) eredményezi. Általában két hasonló méretű és alakú rokon vegyület izostrukturalitása akkor gátolt, ha a fennálló szoros illeszkedést a belépő donorcsoport megváltoztatja. Eltűrt például a 1,4-dihidropirimidinben a metilgyök helyettesítése -NO<sub>2</sub> csoporttal.<sup>81</sup> A H  $\rightarrow$  NO<sub>2</sub> helyettesítés is megengedhet homostrukturalitást. Ezzel ellentétben a hidrofil csoportok, mint pl. az -OH, csak különleges esetekben segítik elő az izostrukturalitás kialakulását. Ilyen pl. a kardiotóniás cinobufagin (**11a**) és cinobufotalin (**11b**) izostrukturalitása,<sup>82</sup> ahol a belépő -OH csoport a szteránváz A és B gyűrűjének *cisz*-anellációjában úgymond „elrejtőzik”.

#### 5.4.4.3. A szénatom kiralitásváltozásának hatása

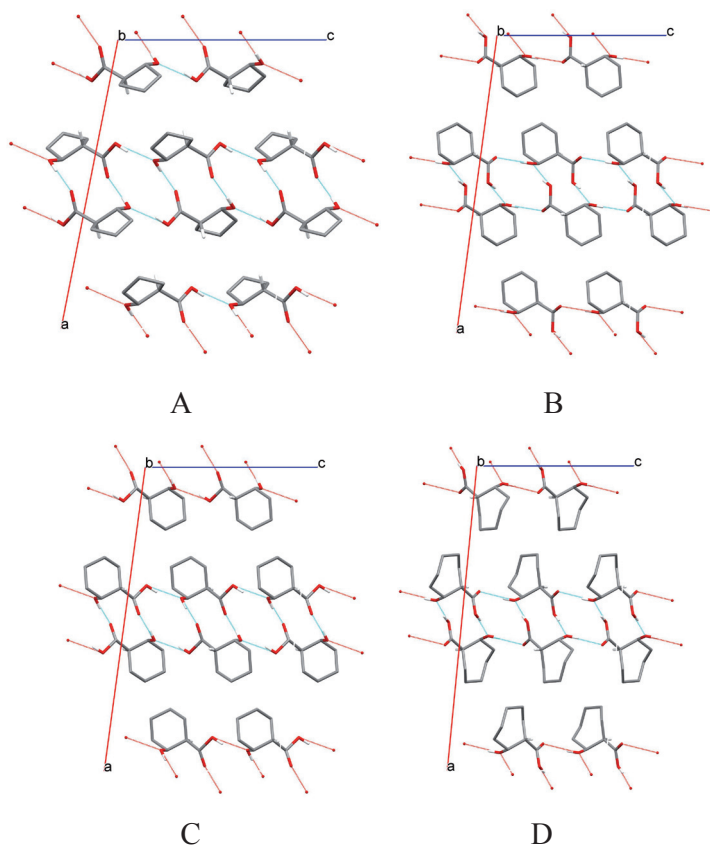
A (21*R*)-<sup>83</sup> és (21*S*)-metildigitoxigenin<sup>68</sup> izostrukturalitásának felismerése tette lehetővé az utóbbi krisztallográfiai fázisproblémájának

megoldását. Ugyanis a (21*R*)-sztereoiszomer ismert fázisaival a (21*S*) szerkezete kiszámítható volt. A metilcsoport eltérő térállásának hatását csökkentette a  $\gamma$ -laktongyűrűk megfelelő elfordulása a digitoxigenin rácsában található üregekben. Ez viszonylag magas izostrukturalitási indexet [ $I_i(19) = 71\%$ ] eredményezett. A kiralitás megváltozásának fokozott hatását az izostrukturalitás fokára a digitoxigenin<sup>66</sup> és a 3-epidigitoxigenin<sup>84</sup> szerkezetének egybevetése mutatta. Noha csak a 3-OH funkció  $\beta$ -, illetve  $\alpha$ -helyzete különbözik, a molekuláris izometritás indexe [ $I_i(26^*) = 88\%$ ] jelentősen eltér az izostrukturalitási indextől [ $I_i(26) = 49\%$ ], jelezve, hogy a kiralitásváltozás hatására a molekulák translációja és forgása jelentős.

#### 5.4.4.4. Morfotrópia okozta korlátok

A *transz*-2-hidroxiciklopentán-1-karbonsav (**t-10a**), a *cisz*-2-hidroxiciklohexán-1-karbonsav (**c-10c**) és a *cisz*-2-hidroxicikloheptán-1-karbonsav (**c-10e**)<sup>75</sup> (5.11. ábra) monoklin rendszerben kristályosodnak (tércsoport  $C2/c$ , 15). Az elemi cellák hasonlósági indexe,  $\Pi_{a/c} = 0,09$  és  $\Pi_{c/e} = 0,04$ , (**t-10a**) és (**c-10c**) gyűrűinek eltérő vetemedése és sztereoiszomérijája magyarázza az alacsony térfogati izostrukturalitást ( $I_v = 45\%$ ) szemben a két *cisz*-sztereoiszomer magasabb izostrukturalitásával ( $I_v = 68\%$ ). A sor következő tagja, a ciklootánszarmazék (**c-10g**) már nem mutat izostrukturalitást a homológ sorral. A sorra jellemző lapcentrált monoklin elemi cella átrendeződik primitív monoklin cellává, tércsoportja  $P2_1/c$  (14) és az *a* tengely hossza (**c-10e**-hez képest megfelelődik (5.2. táblázat). Kitajgorodszkij az ilyen jelenséget, Groth munkájának<sup>1a</sup> említése nélkül, morfotrópiának nevezte. Leírásából kiindulva kimutattuk,<sup>63</sup> hogy morfotrópiának a szoros illeszkedés olyan átrendeződése tekinthető, amelyben az illeszkedés motívuma fennmarad. Az ‘OC’ és ‘OH’ dimerek laterális társulását (**t-10a**), (**c-10c**) és (**c-10e**)

<sup>1a</sup> A morfotrópia elnevezést<sup>85</sup> először Groth használta (1870-1906). Megkísérelte atomokkal (Cl, Br, I), illetve atomcsoportokkal (CH<sub>3</sub>, C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>, NO<sub>2</sub> stb.) végrehajtott hidrogénsubstitúció kémiai rokon kristályokra való hatását leírni. A tapasztalt alakváltozást nevezte morfotrópiának. Mivel Groth becslései a 32 kristályosztályra és a tengelyarányok ismeretére korlátozódtak, megállapításai meglehetősen bizonytalanok voltak. Elemzésének alapvető korlátja a „molekulatérfogató” ( $V^*$ ) használata volt, amit az atomsúly és a mért sűrűség hányadosaként képzett. Csak a röntgenkristallográfia derítette ki, hogy a tényleges molekulatérfogatók ( $V$ ) 1,66*Z*-vel nagyobbak Groth molekulatérfogatainál, ugyanis a kristály tércsoportjától függően az elemi cellában egynél több molekula is lehet. Ezek számát *Z* adja meg. Következésképpen egy szubsztituált kristály alakjának Groth szerinti változása nem korlátozott egy kitüntetett irányra, amint azt feltételezte.



5.11. ábra. A homológ (**t-10a**), (**c-10c**) és (**c-10e**) izostrukturalitása. A ciklopentánhomológban (**t-10a**) 'OC' (akceptor) dimerek kapcsolják az antiparallel láncokban szerveződött molekulákat (A). A (**c-10c**) karboxilcsoportjainak konformációs rendezetlensége az 'OC' dimerek (40%) és az 'OH' dimerek (60%) keveredését mutatják (B és C). A cikloheptánhomológ (**c-10e**) kizárólag 'OH' dimerekből épül fel (D)

kristályokban (közös tércsoport  $C2/c$ , 15) antiparallel tetramerek tartják össze. A további gyűrűnövekedés okozta átrendeződésben az 'OC' és 'OH' dimerek  $90^\circ$ -os átfordulással lineáris társulást formálnak. Ezekben a lineáris társulásokban a „fej-fej” és „farok-farok” kapcsolatok homokirális dimerek. Ezek oldatban létezhetnek, de kristályos állapotban parallel vagy antiparallel spirálokká polimerizálódhatnak. Az előbbi eredményezi a  $P2_1/c$  (14) tércsoportot.<sup>75</sup> Mindenesetre a négy 2-hidroxicikloalkán-1-karbonsav rácsilleszkedésének motívuma a (**t-10a**), (**c-10c**) és (**c-10e**) kristályokban azonos, míg (**c-10g**)-ben morfortróp átrendeződéssel<sup>12</sup> különbözik tőlük.

#### 5.4.4.5. A spontán rezolválódás hatása

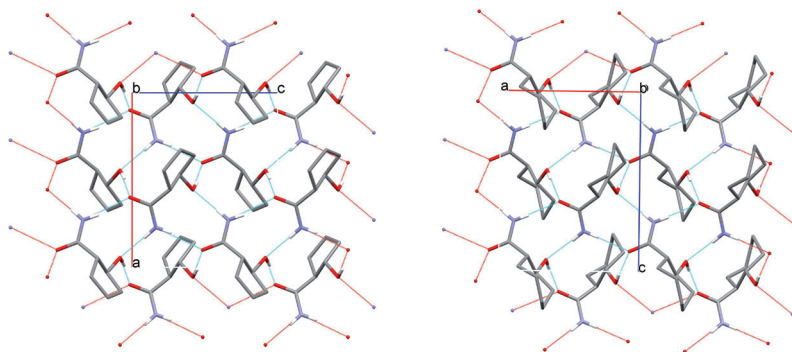
A spontán rezolválódás<sup>86</sup> is korlátozhatja homológok izostrukturalitását, amint az a ciklopentán-, ciklohexán- és cikloheptángyűrűkön formált  $\beta$ -laktámok mutatták. Míg a *cisz*-6-azabiciklo[3.2.0]heptán-7-on (**12a**)<sup>87</sup> és a *cisz*-7-azabiciklo[4.2.0]oktán-8-on (**12b**) monoklin  $P2_1/c$  tércsoporttal magasfokú izostrukturalitást mutat ( $I$  = 0,045;  $I_v$  = 82%),<sup>88</sup> a *cisz*-8-azabiciklo[5.2.0]nonán-9-on (**12c**)<sup>89</sup> spontán rezolválással (tércsoport  $P2_12_12_1$ , 19) rombos kristállyá alakul. A  $2_1$  csavartengelyek körül formált közös spirálok hossza a cikloalkángyűrűk méretével összhangban, szűk tartományban (6,174–6,684 Å) változik.

#### 5.4.5. Kétdimenziós izostrukturalitás váltakozó rétegorientációval

A homológ sorba tartozó *transz*-2-hidroxiciklopentán-1-karboxamid (**t-10b**) és a *transz*-2-hidroxicikloheptán-1-karboxamid (**t-10f**) ismét egy különös jelenséget mutat.<sup>90</sup> Mindkét szerkezetben a molekulspirálokat O–H...O=C hidrogénhidak tartják fenn. Az enantiomer spirálokat ( $\uparrow\downarrow$ ) csúszósíkok kapcsolják tetramerekké. A spirálokat a csúszósíkok mentén N–H...O=C és N–H...O(H) hidrogénhidak is összekötik. A poláris rétegek (**t-10b**)-ben parallel helyzetben helyezkednek el egymáson, ami acentrikus  $Pca2_1$  (29) tércsoporttal rombos kristályt eredményez. (**t-10f**)-ban ugyancsak poláris rétegeket találunk, amelyek csak a cikloheptán gyűrűk méretében különböznek (5.12. ábra). Azonban a cikloheptánszármazék elemi cellájában a poláris rétegek antiparallel irányítással helyezkednek egymásra, ennek következtében az elemi cella térfogata megduplázódik, tércsoportja a centroszimmetrikus rombos  $Pbca$  (61). A közvetlen összehasonlíthatóság érdekében a (**t-10b**) *a* és *c* tengelyét felcseréltük, így a standard  $Pca2_1$  tércsoport  $Pb2_1a$ -ra (29) változik (5.2. táblázat), ami láthatóvá teszi, hogy (**t-10f**) megduplázott *b* tengelye mentén minden második réteg izostrukturális (**t-10b**) parallel rétegeivel. Ez azt jelenti, hogy ha bármelyik kristályban minden második réteget 180°-kal virtuálisan elforgatjuk, a másik ráccsal azonos szoros illeszkedést kapunk.

A váltakozó rétegorientációval leírt 2D izostrukturalitás természetesen nem értelmezhető a Mitscherlich által bevezetett izomorfiával. Míg (**t-10b**) és (**t-10f**) kristályok izostrukturalitása nyilvánvaló, a *b* tengely 2:1 aránya miatt nem izomorfok. Ebből következik, hogy az izomorf elnevezés használata szerves kristályok hasonlóságának leírásához elégtelen.





5.12. ábra. A **(t-10b)** és **(t-10f)** polarizált molekula rétegeinek perspektivikus ábrázolása. Az öt- és a héttagú gyűrűktől eltekintve, a két hálózat alig különbözik

Amint fentebb javasoltuk, a kristályizomorfíát, mint klasszikus morfológiai elnevezést, meg kell különböztetni az izostrukturalitástól.

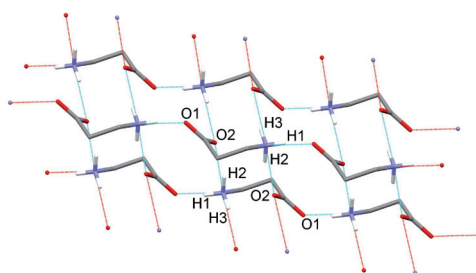
### 5.4.6. Az izostrukturalitás tervezése

A molekula illeszkedés fentebb bemutatott átrendeződése jelzi, hogy az izostrukturalitás megjelenése nem kötött különösen erős intermolekuláris erőkhöz, általában gyenge anizotróp erők határozzák meg, így pl. a molekula alakja. Ezt szem előtt tartva, olyan modellvegyületeket kerestünk, amelyek kis molekulái jól definiált hidrogénhidak képzésére képesek funkciókat hordoznak.

Az 5.9. ábrán bemutatott topológiai vizsgálattal **(9b)**-ből **(t-10g)** szoros illeszkedése is leképezhető. **(9b)** kétdimenziós ábrázolásában az 'OH' dimerekkel a közel merőleges laterális irányú homokirális láncok tetramereket formálnak. E láncok szétszakítását követően az OH...O=C hidrogénhidak lineáris dimer láncokat képezve szinkron átfordulnak. Az eredmény **(t-10g)** rácsmintájának 2D leképezése. A két minta szuperpozíciójából kitűnik, hogy egy megfelelően megtervezett új hidrogénhid mintát alkothat. Ezt a hipotézist OH → NH<sub>2</sub> cserével (karbonsav → karboxamid) **(t-10g)** és **(t-10h)** homostrukturalitása igazolta. Az 'OH' és az 'OC' dimerek kisebb topológiai átrendeződésével a harmadik hidrogénhid a szoros illeszkedés változása nélkül tökéletesen beépült **(t-10h)** rácsába.<sup>75</sup> Ez a modellezés vezetett a *cis*-cikloalkil-1-karbonsavak **(c-10b–c-10g)** 2-OH csoportjának -NH<sub>2</sub> csoporttal való helyettesítésére.<sup>91</sup> Amint reméltük, a négy ciklusos *cis*-β-aminosav, noha ikeriont képeznek, triklin ( $P\bar{1}$ , 2) tércsoport mellett izostrukturalitást mutattak. Mind a négy rácsban a hidrogénhid-



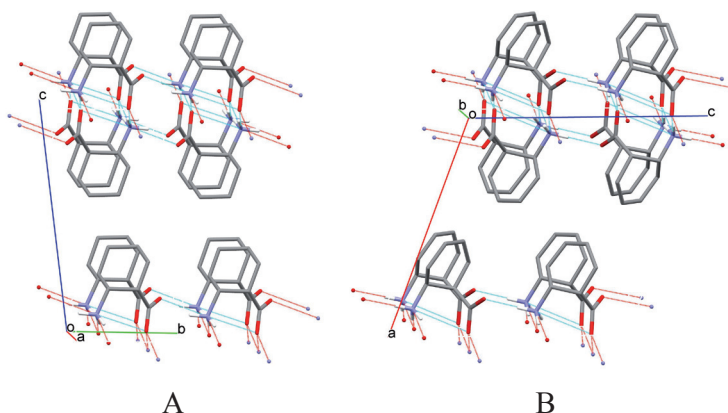
kapcsolat azonos. Mindegyik molekula két, kémiai azonos dimer része. A dimereket az N1-H1b...O2 és az N1-H1c...O2 hidrogénhidpáros zárja. Az ammóniumion harmadik hidrogénhídja (**13a-d**) egy transzlált, azaz másik elemi cellában ülő molekula O2-oxigénjével alkot végtelen láncot (5.13. ábra). A varakozásnak megfelelően a teljes minta a 2D hálózat topológiáját igazolta. A ciklusos *cisz*- $\beta$ -aminosavak öröklik a kiindulási (**9b**) és (**t-10g**) vegyületek molekuláris elrendeződését. A molekulák hasonló elrendeződésében felismerhetők mind a lineáris, mint a laterális dimerek. A (**13a-d**) kristályszerkezetekben mindegyik hidrogénhidcsoport végtelen hidrofíl rétegekben lokalizált. Az aliciklusos gyűrűk ezen rétegek felett és alatt helyezkednek el, ezáltal a kristályokban hidrofób tartományokat képeznek. A hidrogének kapcsolta kettős rétegek önszerveződésűek, a hidrofób felületek között gyenge van der Waals-erők működnek.



5.13. ábra. Az aliciklikus *cisz*- $\beta$ -aminosavak kristályainak (**c-13a-d**) hidrogénhid-hálózata a gyűrűk elhagyásával. Az ikerionokban minden egyes  $\text{-NH}_3^+$  csoport a karboxilcsoport oxigénjeivel három hidrogénhidat képez, az egyik oxigén „bifurkális” karakterű

A négy ciklusos *cisz*- $\beta$ -aminosav homológ izostrukturalitása azt sejtette, hogy a kombinált hidrogénhidak elég erősek kettős rétegek tervezésében, ezért további négy ciklusos  $\beta$ -aminosav szoros illeszkedését vizsgáltuk meg. Először (**c-13b**) származékának, a *cisz*-2-aminociklohex-4-én-1-karbonsavnak a kristályszerkezetét határoztuk meg. Az eredeti minta szimmetriája átrendeződik, így (**c-14**) monoklin  $P2_1/c$  (14) tércsoporttal kristályosodik. A hidrogénhid-hálózat topológiája azonban a ciklusos *cisz*- $\beta$ -aminosavakban megismertekhez hasonló marad (5.14. ábra). A molekulák öntársulása is hasonló. A szimmetriában mutatkozó különbséget a lineáris és laterális társulásmintákban minden második molekula különböző orientációja mutatja. A (**c-14**) szoros illeszkedése tehát hidrogénhidak kettős rétegeivel jellemezhető. Elemi cellája a telített formából egy csúszósíkkal levezethető, amely megkettőzi az eredeti

elemi cellát. Ezekből következik, hogy a kombinált hidrogénhid-mintázat elég erős a telítettől telítetlenre változó molekulák összetartásában.



5.14. ábra. A *cisz*-2-aminociklohexán-1-karbonsav (**c-13b**) és a telítetlen (ciklohexén-) származékának (**c-14**) kristályszerkezete. Bár kristályrendszerük különböző, triklin ( $P\bar{1}$ , 2) (A), illetve monoklin ( $P2_1/c$ , 14) (B), szoros illeszkedésük láthatóan igen hasonló

Hogy az illeszkedési mintát még tovább terheljük, két ciklusos *transz*-2-aminociklohexán-1-karbonsavat (**t-13b**) és telítetlen formáját, a *transz*-2-aminociklohex-4-én-1-karbonsavat (**t-14**) is bevontuk a vizsgálatok sorába.<sup>91</sup> Szerkezetük  $P2_1/c$  (14) tércsoport mellett magasfokú izostrukturalitást mutatott, azonban (**c-14**) térszerkezetétől teljesen eltértek. Ez az -OH funkciót hordozó szénatom különböző kiralitásával magyarázható. Mindezek ellenére a hidrogénhid-kapcsolat a  $P2_1/c$  tércsoportú kristályoknál azonos, (**t-13b**) és (**t-14**) mindegyik molekulája két dimerben vesz részt. Ezek a dimerek ugyanúgy, mint (**c-14-ben**),  $2_1$  csavartengely kapcsolta molekulákból épülnek fel, és ezeket két szimmetriafüggetlen hidrogénhid tart össze. A (**13a-d**) és a (**c-14**) kristályokkal ellentétben ezeknek a hidrogénhidaknak egyike akceptorként az O2-atomot foglalja magában. Ez azt jelenti, hogy a tervezett hálózat atomi szintű kisebb topológiai változásokkal túlélte a *cisz-transz* izomerek váltását, molekuláris szinten a társulások fennmaradtak.

A ciklusos  $\beta$ -aminosavak tervszerűen végrehajtott szerkezetvizsgálata meggyőzően mutatta meg négy homológ izostrukturalitását, amelyek racionális tervezésében erős hidrogénhidak kétdimenziós hálózatát használtuk fel. A telítetlen *cisz*-származékok és *transz*-sztereoizomerjeik lehetővé tették annak követését, hogy a kiindulási mintáktól eltávolodva ugyan, az alapvető térszerkezeti jellemzők változatlanok maradtak.

### 5.4.7. Molekulatársulások, zárványkomplexek izostrukturalitása

A molekulatársulások által mutatott szerkezeti hasonlóság első eseteként az 5-szulfametoxidiazin (**15**) (SMD) kloroform, 1,4-dioxán és THF komplexeire<sup>71</sup> hivatkoztunk. A jelenség okaként az SMD-váz azonos vendégmolekulákkal töltött üregeiben kialakuló gyenge gazda-vendég kölcsönhatásokat tekintettük. Számításba veendő természetesen a három vendégmolekula alakjában mutatkozó hasonlóság is. Az elmúlt évtizedekben számos új, izostrukturalitást mutató molekulatársulást fedeztek fel, ezeket Caira egy *review* dolgozatban<sup>92</sup> foglalta össze.

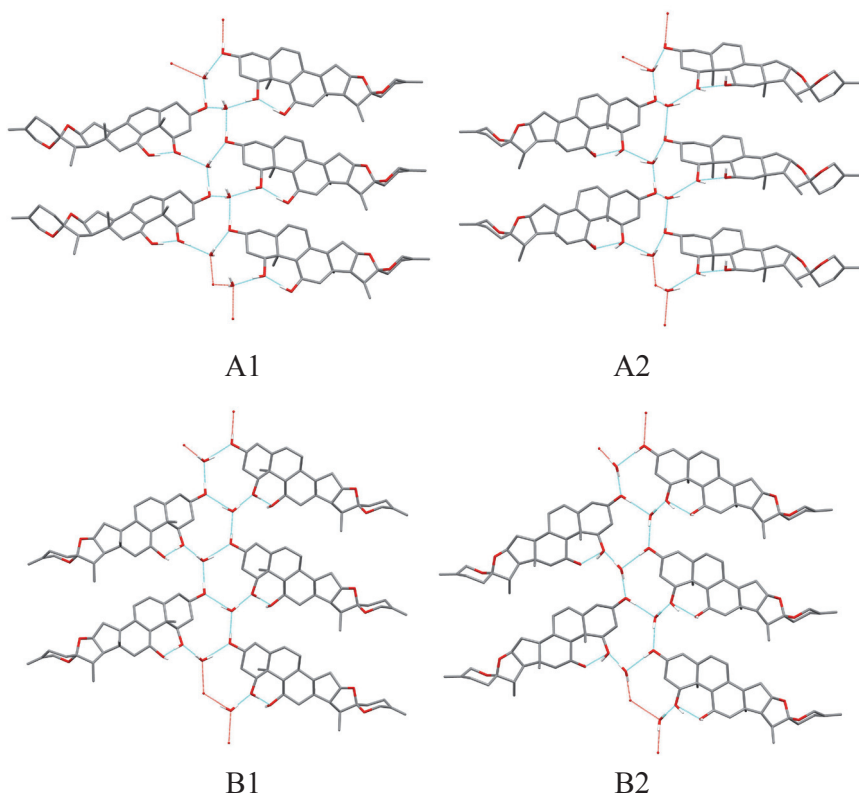
### 5.4.8. Izostrukturalitást mutató polimorfok

Először egy szteroid monohidrát két polimorfjának térszerkezetében ismertünk fel parciális hasonlóságokat. Ezt követően a *transz*-2-hidroxicyklopentán-1-karbonsav két dimorfjáról derült ki, hogy azonos elemi cellával kristályosodnak. Átvizsgáltuk a CSD-t<sup>19</sup> olyan polimorfokat keresve, amelyeket az izostrukturalitás valamilyen foka<sup>93</sup> jellemez. 22 polimorf rácsában egy-, kettő-, sőt háromdimenziós izostrukturalitási motívumok találhatóak. Kitűnt, hogy a kristályszerkezetek fokozatos rendeződésével háromdimenziós izostrukturalitás is észlelhető, továbbá az egy- és kétdimenziós izostrukturalitás pedig gyakran kötődik különleges illeszkedési kölcsönhatásokhoz. Végül bemutatunk egy polimorf párost, amely valóban három dimenzióban mutat izostrukturalitást.

#### 5.4.8.1. Polimorfok izostrukturalitása két dimenzióban

A 1 $\beta$ ,3 $\beta$ ,11 $\alpha$ -trihidroxispiroszta-5,25(27)dién (**16**) (5.15. ábra) etanolból monohidrátként kristályosodik (op. 519-522 K). A szerkezetet alkotó szimmetriafüggetlen szteroid-víz kettősrétegeket hidrogénhidak kötik át.<sup>94</sup> Tizenkét évvel később újabb *Helleborus* fajtából újra egy monohidrátot sikerült abszolút alkoholból kikristályosítani, ami azonban valamivel magasabb hőmérsékleten (525-526 K) olvadt. A polimorf B-nek nevezett új forma röntgendiffrakciós vizsgálata<sup>95</sup> ismét a C<sub>27</sub>H<sub>40</sub>O<sub>5</sub> összegképletű molekulák és a víz két kettősrétegét azonosította. Relatív elhelyezkedésük azonban különbözik attól, amit az első módosulathoz (polimorf A) észleltünk. A szoros illeszkedésük elemzéséből kitűnt,<sup>96</sup> hogy

mindkét módosulatban egy-egy réteg (B1 és A2) megegyező, míg a másik két rétegben (B2, A1) a vízmolekula irányítottága egymástól különböző, és különbözik a közös rétegekben mutatott irányítottságtól is (5.15. ábra).



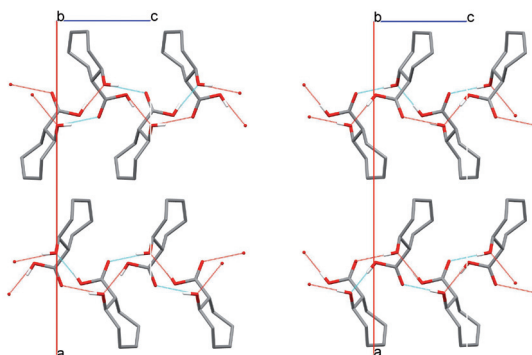
5.15. ábra. A (16) A és B polimorfjainak szimmetriafüggetlen rétegei. Kiseb konformációs különbségektől eltekintve a B1 és az A2 rétegek izostrukturalitást mutatnak, míg a B2 és A1 réteg a vízmolekulák librációjának eredményeképpen a szomszédos síkjaikkal képzett hidrogénhidakban különböznek

Ez két különböző szoros illeszkedéshez vezet. Az A formában négy egymást követő rétegben két homomolekuláris (hidroxil-hidroxil és víz-víz) hidrogénhídpáros, míg a B formában csupán két heteromolekuláris hidroxil-víz alkotta hidrogénhid található. Ennek következménye, hogy B1 és A2 rétegek két dimenzióban izostrukturalitást mutatnak, míg a B2 és A1 rétegek a vízmolekulák a W-H...O kötés körüli 90°-os elfordulásban különböznek. Az alapmotívum azonban a B2 és A1 rétegek között sem különbözik. Három dimenzióban a vízmolekulák különböző elfordulása az oxigén pozíciójuk körül okozza a rétegek szoros illeszkedésének

különbségét, az elemi cellájuk eltérése (5.2. táblázat) által is egyértelműen mutatott polimorfíát.

### 5.4.8.2. Polimorfia azonos elemi cellával

A *transz*-2-hidroxicikloheptán-1-karbonsav (**t-10e**) szerendipitással kísért kristályosítása két kristályformát eredményezett,<sup>97</sup> ami egy alig felismerhető polimorfának bizonyult.<sup>25</sup> A dibutilérből nyert kristályok (I) és a dietilérből nyert termék (II) megkülönböztethetetlen elemi cellát mutattak, csupán rombos tércsoport-szimmetriájukban,  $Pna2_1$  (33) és  $Pn2_1a$  (felcserélt tengelyválasztás), különböztek (5.16. ábra).



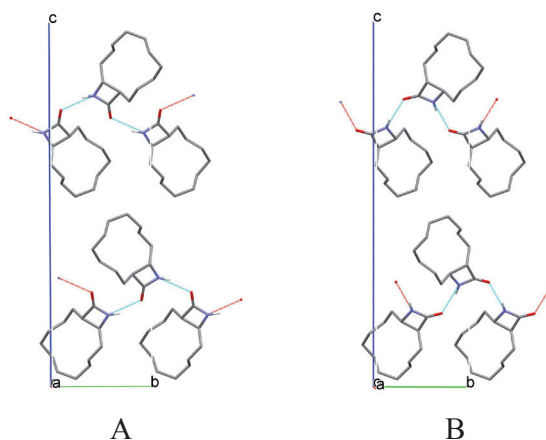
5.16. ábra. A (**t-10e**) virtuálisan azonos elemi cellában felépülő dimorfjai a cellák alsó felében azonosak, míg az felső félben nem-kristallográfiai digir körüli elfordulásban különböznek

Szerkezetfelderítésük antiparallel, illetve parallel rétegilleszkedést derített fel. (I) és (II) dimorfok közös vonása az  $R_4^4(18)$  gráfotívum<sup>98</sup> jelezte antidrom<sup>99</sup> gyűrűk formálódása, amelyek jelentős dipólusmomentum képződésével járnak. Jeffrey és Saenger<sup>100</sup> szerint a dipólusoknak makroszkopikusan ki kell oltaniuk egymást. Ez történhet az elemi cellák antiparallel elrendeződésével, vagy a kristály doménjeinek antiparallel illeszkedésével. A (**t-10e**) dimorfjai ezt az alternatív formát képviselik: antiparallel rétegilleszkedést (II), illetve antiparallel doménscsomagolást (I) mutatnak. Mindkét kristályban rétegenként az antidrom gyűrűk eredő dipólusmomentuma a *c* tengely irányába mutat. A (II) dimorf elemi cellájában (tércsoport:  $Pn2_1a$ ) a kétfogású csavartengely merőleges a dipólus vektorára, míg (I) rácsában (tércsoport:  $Pna2_1$ ) párhuzamos vele. Az utóbbi esetben a gyűrűk dipólusai párhuzamosak maradnak. Az (I) polimorf kötelező antiparallel rétegű elrendeződése Jeffrey és Saenger

szerint domének formálásával oldódik meg. Amint az 5.16. ábrán látható, az elemi cellák alsó fele azonos. A felső félrészben a kölcsönösen merőleges, azaz  $a$ ,  $b$  és  $c$  tengely körüli  $2_1$  rotációkat egy kétfogású tengely (digír) tartja össze, amelynek az elfordulása az egyik elemi cella  $a$  tengelye körül  $180^\circ$  fokkal, az alsó félcellákat azonosossá teszi. Ezáltal a két módosulat tökéletes 2D izostrukturalitása váltakozó rétegorientációval valósul meg. (II) szomszédos antiparallel rétegei helyett (I) doménjeit gyenge van der Waals-erők tartják össze. (I) polimorf váltakozó vastagságú doménjei antiparallel rendben helyezkednek egymásra. Mivel minden doménhatáron váltakozó irányú rétegek találkoznak, (I) forma véletlenszerűen, de kikerülhetetlenül higítva van (II) antiparallel felépítésű rétegeivel. Így (I) soha nem állítható elő tisztán, mindig szennyezett lesz (II) antiparallel rétegekből álló elemi celláival. Ezt az (I) kristályszerkezetének korlátozott finomíthatósága igazolta,  $R$  jósági tényező nem volt 0,11 alá csökkenthető. Összefoglalva: (t-10e) polimorfája rétegenként kétdimenziós izostrukturalitást mutat, azzal a különbséggel, hogy a rétegek orientációja szabályszerűen váltakozik (II), vagy csupán doménenként (I).

### 5.4.8.3. Polimorf izostrukturalitás három dimenzióban

A háromdimenziós izostrukturalitás valamilyen formáját mutató<sup>93</sup> hat szerkezet közül a 7*b*-(2,4-dinitrofenil)fluoradén (17) különösen figyelemreméltó.<sup>101</sup>



5.17. ábra. A (12h)  $\beta$ -laktám I (A) és II (B) módosulatai. A nagyon hasonló méretű elemi cellákban a monoklin  $b$  tengely mentén két végtelen, antiparallel viszonyban álló molekulalánc formálódik. Ezeken belül a 10-tagú aliciklusos gyűrű  $180^\circ$ -os elfordulása a végtelen  $-\text{NH}\cdots\text{OC}-$  hidrogénhidak irányát felcseréli

Mindkét módosulat  $P2_1/c$  (14) tércsoporttal kristályosodik, csupán az egyik elemicella-paraméterük különbözik, az  $a$  tengely kétszer olyan hosszú a (II) formában, mint az (I) módosulatban (ld. a [93] közleményben a 3. ábrát). 3D-izostrukturalitásuk a (II) módosulatban felismerhető pszeudotranszlációval jellemezhető, ami a (I) formában valódi krisztallográfiai transzláció. Bár mindkét forma rendezettnek tűnt, némi diffúz szórást is tapasztaltak. Ellentétben (**t-10e**) polimorfijával, ezek a módosulatok mint egydimenziós polimorfok<sup>102</sup> a szerves kristályok között észlelt legegyszerűbb politípeknek tekinthetők.<sup>97</sup>

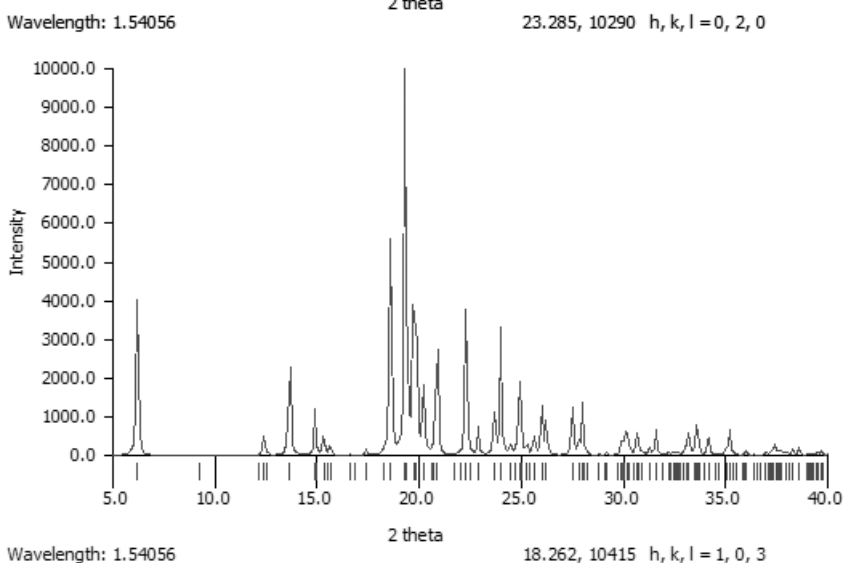
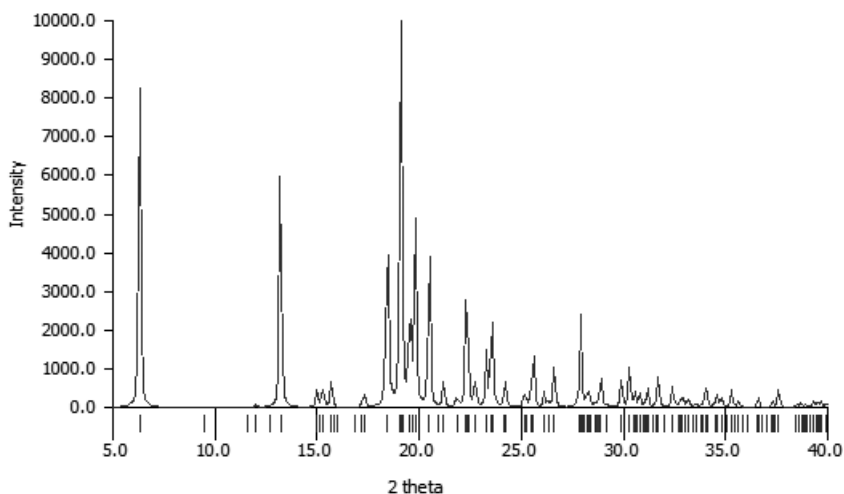
#### 5.4.8.4. Valós molekulaelfordulások polimorfokban

A *transz*-13-azabicyclo[10.2.0]tetradekán-14-on (**12h**) az izostrukturalitás egyedülálló formáját képviseli. A polimorfok ugyanis a molekulákat összekötő hidrogénhidak  $\beta$ -laktámrészlethez való orientációjában különböznek (5.17. ábra).<sup>103</sup> Ez a látszólag kis különbség a  $C_2$  szimmetriájú 12-tagú karbociklusos makrogyűrű kétfogású tengely szerinti  $180^\circ$ -os elfordulásának<sup>2b</sup> köszönhető. Az azetidín-2-on gyűrű lapított spirálban két különböző orientációt vehet fel: (a) a C=O kötés közel merőleges, ill. (b) közel párhuzamos az azonos tércsoport ( $P2_1/c$ ) csavartengelyével. Az első esetben (I) az oxigén egyik magános,  $\beta$ -laktámrészlettől távoli (*distal*) elektronpárja formál hidrogénhidat a szomszédos molekulával (5.17.A ábra). Ezek a molekulák a  $\beta$ -laktámrészlettel antiperiplanáris konformációt mutató hidrogénhidakkal kapcsolódnak össze. A második esetben (II) az oxigén közeli (*proximal*) magános elektronpárja formál hidrogénhidat (5.17.B ábra), amely most szinperiplanáris konformációt mutat a  $\beta$ -laktámrészlettel. Az eredmény a rövidebb  $b$  tengely (5.2. táblázat) a (II) módosulatban. Az elemi cella hasonlósági indexe  $I = 0,008$  és a térfogati index  $I_v = 75\%$  magas értéke szerint izostrukturalisak. Polimorfijukat a pordiffrakciós röntgenfelvételek különbsége mutatja (5.18.a és 5.18.b ábra). A két szerkezet látható különbsége az  $NH\cdots O=C$  hidrogénhid ellentétes iránya a csavartengely mentén.

(**12h**)-hoz hasonlítva, azonos elemi cella mellett a *transz*-2-hidroxicikloheptán-1-karbonsav (**t-10e**) dimorfjai a fél elemi cella  $180^\circ$ -os elfordulásában különböznek. A nitrofurantoin<sup>42</sup> vízmentes formái közül

<sup>2b</sup> Az angolszász irodalomban a „non-crystallographic rotation” (forgás) kifejezést használtuk. Mivel a *forgás* csupán  $90^\circ$ - vagy  $180^\circ$ -os, magyar szövegben az *elfordulás* jobban tükrözi két vagy több kristályszerkezet különbségét.





5.18. ábra. A (12h) két monoklin ( $P2_1/c$ , 14) módosulatának atomi koordinátáiból számított röntgendiffrakciós pordiagrammja (PXR). A porfelvételek a polimorfját igazoló különbségeket mutatnak

a monoklin polimorf molekulspiráljának egyik oldalán a  $2_1$  tengelyre merőlegesen minden egyes molekula  $180^\circ$ -kal elfordul. Az eredmény triklin dimerek füzére az eddigi  $b$  tengely mentén (lásd a [104] közleményben a 7. ábrát). Hasonló típusú átrendeződés kapcsolja össze a 3-nitrofenol monoklin (tércsoport  $P2_1/n$ , 14)<sup>105</sup> és a rombos (tércsoport  $P2_12_12_1$ , 19)<sup>106</sup> kristályát. Minden második akirális molekula oda  $\leftrightarrow$  vissza  $180^\circ$ -os elfordulása létesít dimorf kapcsolatot.



5.2. táblázat. Az elemi cella paramétereinek egybevetésével diszkutált kristályszerkezetek

Kristály	$a / \text{Å}$	$b / \text{Å}$	$c / \text{Å}$	$\beta / ^\circ$	$V / \text{Å}^3$	$D_m / \text{g cm}^{-3}$	Tér- csoport
(c-10e)	22.876(5)	6.224(1)	11.793(2)	95.56(3)	1671.2(5)	1.257	$^{\gamma}I2/c$
(c-10g)	11.082(1)	7.618(1)	11.579(1)	105.67(1)	941.2(2)	1.215	$P2_1/c$
(t-10b)	8.250(2)	8.410(2)	9.879(2)		685.4(3)	1.252	$*Pb2_1a$
(t-10f)	8.248(1)	19.679(3)	10.581(1)		1717.4(4)	1.216	$Pbca$
(18) (A)	10.085(4)	7.854(2)	31.956(2)	93.11(3)	25274 (2)	1.216	$P2_1$
(18) (B)	13.033(1)	8.314(1)	23.823(2)	105.17(1)	2491.4(4)	1.233	$P2_1$
t-10e (I)	21.184(3)	6.824(1)	5.892(2)		851.7(3)	1.234	$Pna2_1$
t-10e (II)	21.185(2)	6.826(1)	5.889(1)		851.6(3)	1.234	$^+Pn2_1a$
t-12h (I)	5.858(1)	7.629(1)	28.237(3)	97.97(1)	1249.7(3)	1.113	$P2_1/c$
t-12h (II)	5.962(1)	7.267(1)	28.689(1)	94.90(1)	1238.4(3)	1.123	$P2_1/c$

$^{\gamma}$  a  $C2/c$ , \* a  $Pca2_1$  és  $^+$  a  $Pna2_1$  tércsoport nem kanonikus formája

## 5.5. Nem-krisztallográfiai elfordulások rokon vegyületek között

### 5.5.1. Virtuális molekulaelfordulások

Nem-krisztallográfiai elfordulások kapcsolják össze a (c-10g) kristályt (tércsoport  $P2_1/c$ , 14) a homológ sorba sorolható (t-10a), (c-10c) és (c-10e) kristályokkal (tércsoport  $C2/c$ , 15), azonban – a polimorfiaival szemben – a bemutatott rokon vegyületek (párok, illetve csoportok) közös motívumának nem-krisztallográfiai elfordulása csak virtuális.

### 5.5.2. Morfotrópia: az izostrukturalitást gátló tényező

Míg a merev (rigid  $\leftrightarrow$  szemirigid) molekulák egymáshoz viszonyított, külső hatásoktól irányított, nem-krisztallográfiai elfordulása(i) dimorfokat, polimorfokat képezhet(nek), a rokon vegyületek izomer, illetve egy-két szubsztituensben különböző molekulái között felismerhető nem-krisztallográfiai elfordulások morfotróp párokat (csoportokat) alkotnak.

Nem-krisztallográfiai elfordulást először a 14. csoport elemei által képzett, izostrukturalitást mutató  $\text{Ph}_3\text{E}-\text{E}'\text{Me}_3$  (E, E' = Si, Ge, Sn, Pb)

vegyületek sorában észleltünk.<sup>57</sup> Az aszimmetrikus  $\text{Ph}_3\text{E}-\text{E}'\text{Me}_3$  „súlyzók” szimmetriacentrum által összetartott antiparallel ( $\uparrow\downarrow$ ) párokat képeznek, közös tércsoportjuk  $\overline{P3}$  (147). Kivétel a  $\text{Ph}_3\text{Ge}-\text{SnMe}_3$  /  $\text{Ph}_3\text{Sn}-\text{GeMe}_3$  izomerpár, ezek a kristályok parallel ( $\uparrow\uparrow$ ) molekulatársulással rombos  $\text{Pna}2_1$  (33) tércsoportba szerveződnek. Kitajgorodszkij enigmatikus értelmezését átvéve a jelenséget morfofotrópiának neveztük. Mélyebb értelmezése megfelelő kísérleti adatok nélkül nem volt lehetséges, ezért általánosítva, morfofotrópiaként írtuk le az izostrukturalitást mutató molekulák szubsztitúcióból eredő szorosilleszkedés-csökkenését ( $< 60\%$ ) akadályozó szerkezeti átrendeződéseket. Így pl. a Bernstein és munkatársai<sup>56</sup> által közölt *para*-diszubsztituált benzilidén-anilinek ( $\text{R}-\text{C}_6\text{H}_4-\text{CH}=\text{N}-\text{C}_6\text{H}_4-\text{R}'$ ; R, R' = Me, Cl, Br) izostrukturalitásának korlátait morfofotróp lépéseknek neveztük.

2002-ben Kitajgorodszkij morfofotrópiájának és az izostrukturalitás összefüggéseinek tisztázását javasolta Bernstein.<sup>3c</sup> A vizsgálat ahhoz a felismeréséhez vezetett, hogy a morfofotrópia, a szó etimológiai értelmezésével (*morphos* = *shape*/alak, *tropos* = *turn*/forgás) összhangban, az érintett molekulák virtuális nem-krisztallográfiai elfordulásainak eredője.<sup>104</sup> Ezek érinthetik az elemi cella összes molekuláját szinkronban, avagy csak egy részét, rendszerint felét, valamilyen rendben, míg az elfordulások mértéke lehet  $180^\circ$ ,  $90^\circ$ , illetve ritkábban  $60^\circ$ . A morfofotrópok, a közöttük lévő, egymást követő virtuális elfordulások számától függően, különböző rendű (fokú) izostrukturalitást mutathatnak.

Kitajgorodszkij a morfofotróp átrendeződés példajaként a tetrafenilón,  $\text{Ph}_4\text{Sn}$  (tércsoport  $\overline{P42_1c}$ , 114) tetragonális kristályának a *p*- $\text{C}_2\text{H}_5\text{O}$  csoporttal történő szubsztitúció hatására képződött monoklin (tércsoport  $\text{P}2_1/c$ , 14) kristályát említi. Ebből kiindulva a  $\text{Ph}_4\text{Sn}$  CSD-ben<sup>19</sup> azonosított nyolc származékának szerkezetét egybevetve kimutattuk,<sup>107</sup> hogy morfofotróp átrendeződésük többségében virtuális molekulaelfordulások eredménye.

### 5.5.3. A 2,4,6-triariloxi-1,3,5-triazinok hierarchikus morfofotrópiája

A morfofotrópia vizsgálatát folytatva kimutattuk, hogy a korlátozottan hajlékony 2,4,6-triariloxi-1,3,5-triazin molekulák is nem-krisztallográfiai elfordulások sorozatával létesítenek homológok (F, Cl, Br, I) és izomerek (*meta* és *para*) között morfofotróp kapcsolatot. Piedfort-komplexeket<sup>108</sup>

<sup>3c</sup> magánközlemény, 2002

tanulmányozva kitűnt, hogy az általunk meghatározott 2,4,6-trisz(4-metilfenoxi)-1,3,5-triazin (4-MePOT) szerkezete<sup>109</sup>, a tércsoportbeli különbség ellenére (*R3c*), izostrukturalitást mutat a bázismolekula (2,4,6-trifenoxi-1,3,5-triazin (POT))<sup>110</sup> tércentrált monoklin rácsával (tércsoport *Ia*, 9). Ugyanígy izostrukturalitást mutatott POT és 4-MePOT rácsával a *para*-bróm- (4-BrPOT),<sup>111</sup> továbbá Báthori Nikoletta „Triazinvázu C<sub>3</sub> szimmetriájú gazdavegyületek szintézise és kristályszerkezetük meghatározása” című doktori értekezésében<sup>4d</sup> szereplő 1,3,5-triazinok közül a *para*-jód- (4-IPOT), a *para*-izopropil- (4-iPrPOT) és az *orto*-metil- (2-MePOT) származék. A CSD<sup>19</sup> lekérdezése trigonális *P3c1* (165) tércsoporttal három Piedfort-egységet (3-BrPOT, 3-CIPOT és 3-MePOT) tárt fel.<sup>112</sup> *R3* tércsoporttal egyedülálló szerkezetnek bizonyult viszont a fenti halogénszármazékok jódhomológia, a 3-IPOT.<sup>113</sup> A várttól eltérően a *para*-fluor-származék (4-FPOT)<sup>114</sup> viszont monoklinnak bizonyult, tércsoport *P2<sub>1</sub>/c* (14). Az 5.3. táblázatban felsorolt kristályszerkezetek az izostrukturalitás és a morfofotrópia elválaszthatatlan egységét mutatják. Elemzésük alapján<sup>110-114</sup> a következő összefüggéseket ismertük fel.<sup>115</sup>

5.3. táblázat. A 2,4,6-triariloxi-1,3,5-triazin származékok (POT) krisztallográfiai adatai

Vegyület	CSD-kód <sup>19</sup>	Tércsoport	Elemicella-paraméterek
POT	VALDIV	<i>Ia</i> <sup>110</sup>	$a = 12,649^+$ , $b = 20,903$ , $c = 6,601^+$ Å, $\beta = 97,93^\circ$
4-FPOT	XOLRUL	<i>P2<sub>1</sub>/c</i> <sup>114</sup>	$a = 12,532$ , $b = 21,363$ , $c = 6,872$ Å, $\beta = 96,99^\circ$
2-MePOT	nem publikált	<i>R3c</i> *	$a = b = 20,593$ , $c = 8,605$ Å, $\alpha = \beta = 90^\circ$ , $\gamma = 120^\circ$
4-MePOT	CENFOQ01	<i>R3c</i> <sup>112</sup>	$a = b = 23,644$ , $c = 6,664$ Å, $\alpha = \beta = 90^\circ$ , $\gamma = 120^\circ$
4-iPrPOT	nem publikált	<i>R3c</i> *	$a = b = 24,259$ , $c = 7,805$ Å, $\alpha = \beta = 90^\circ$ , $\gamma = 120^\circ$
4-BrPOT	HEXWIQ01	<i>R3c</i> <sup>111</sup>	$a = b = 23,869$ , $c = 6,468$ Å, $\alpha = \beta = 90^\circ$ , $\gamma = 120^\circ$
4-IPOT	nem publikált	<i>R3c</i> *	$a = b = 24,831$ , $c = 6,627$ Å, $\alpha = \beta = 90^\circ$ , $\gamma = 120^\circ$
3-IPOT	CAVRUN	<i>R3</i> <sup>113</sup>	$a = b = 23,421$ , $c = 7,301$ Å, $\alpha = \beta = 90^\circ$ , $\gamma = 120^\circ$
3-MePOT	VALMAW	<i>P3c1</i> <sup>112</sup>	$a = b = 13,023$ , $c = 14,334$ Å, $\alpha = \beta = 90^\circ$ , $\gamma = 120^\circ$
3-CIPOT	VALGAQ	<i>P3c1</i> <sup>112</sup>	$a = b = 12,975$ , $c = 14,193$ Å, $\alpha = \beta = 90^\circ$ , $\gamma = 120^\circ$
3-BrPOT	VALHUL	<i>P3c1</i> <sup>112</sup>	$a = b = 13,121$ , $c = 14,421$ Å, $\alpha = \beta = 90^\circ$ , $\gamma = 120^\circ$

\*Dr. Báthori Nikoletta magánközleményei (Doktori értekezés, BME, Budapest, 2006.)

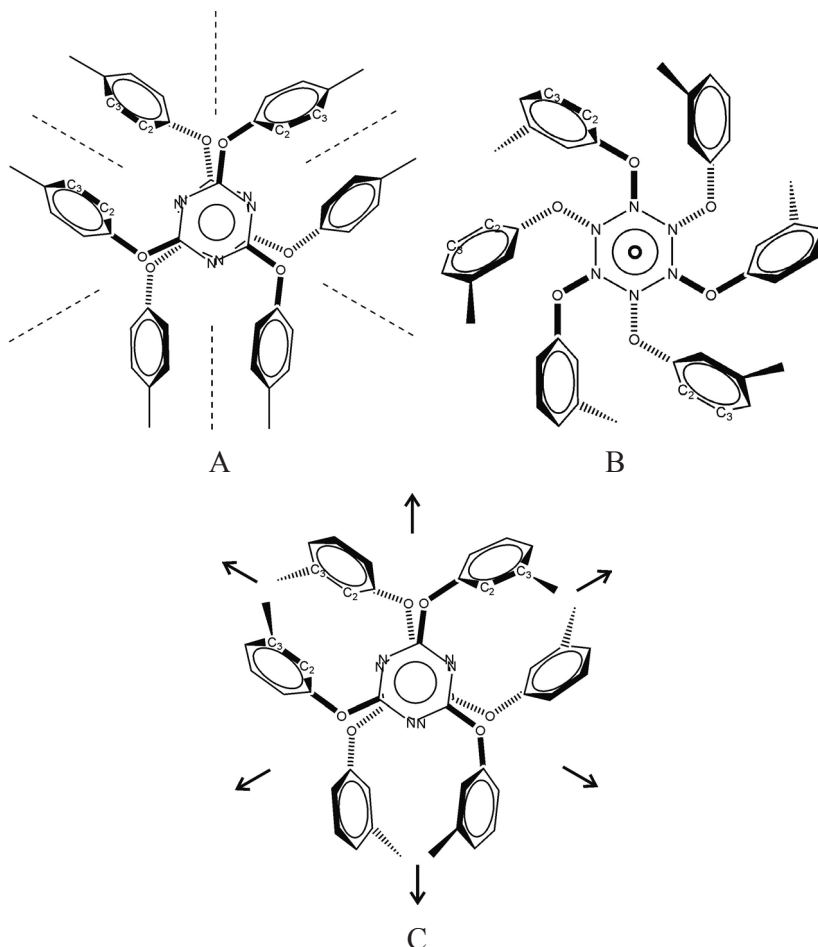
+ A tércentrált monoklin rács *a* és *c* tengelye a jobb összehasonlítás céljából felcserélve.

<sup>4d</sup> (BME, 2006, Budapest)

1) POT és *para*-bróm származéka a kristályrendszer (monoklin  $\leftrightarrow$  romboédres) és tércsoport (*Ia* és *R3c*) különbsége ellenére izostrukturalitást mutatnak. A két szerkezet szuperpozíciójából látható, hogy 4-BrPOT molekuláit a  $C_3$  tengely mentén három, egymással  $60^\circ$ -os szöget bezáró csúszósík tartja össze (5.19.a ábra). A szubsztituensmentes POT centrált rácsában, az *Ia* tércsoporttal összhangban, már csak egy csúszósík található. Ez olyan szabadsági fokot biztosít POT molekuláinak, hogy a kisméretű fluoratomok *para*-helyzetben<sup>114</sup> minden második molekulasor szinkron  $180^\circ$ -os elfordulásával új szoros illeszkedésű primitív monoklin rácsot formálnak. A csúszósík  $\rightarrow$  szimmetriacentrum váltás eredménye ismét a  $P2_1/c$  (14) tércsoport, együtt másodfokú izostrukturalitással morfortróp párt képeznek.

2) POT kristályrácsa az *R3c* (161) tércsoportú többi *para*-szubsztituált származékkal (4-IPOT, 4-BrPOT, 4-MePOT és 4-iPrPOT), valamint az *orto*-metil- (2-MePOT) kristállyal homostrukturalisnak tekinthető. Az öt származék kristálya egymás között elsőfokú izostrukturalitást mutat. E megállapítás érvényes az *orto*- és *para*-metil-izomerekre is, ámbar az izostrukturalitásuk foka a metilcsoport  $o \rightarrow p$  vándorlása következtében valamelyest csökken. A molekula kiterjedése megnő, az elemi cella térfogata azonos móltömeg (399,44) mellett 2%-kal növekszik.

3) A négy *para*-szubsztituált származék és az egyetlen  $\bar{R3}$  (148) tércsoporttal kristályosodott jódízomer 3-IPOT<sup>113</sup> morfortrópiája a korlátozott flexibilitású 4-IPOT lehetséges átrendeződéséből vezethető le. A *meta*-szubsztitúció következtében minden második PU (*Piedfort unit*) a  $C_3$  tengelyre merőlegesen  $180^\circ$ -kal átfordul, majd az egymáson ülő nemplanáris molekulák közötti ütközést elkerülendő, az átfordult molekulák a  $C_3$  tengely körül még  $60^\circ$ -kal szinkron elfordulnak. A két egymást követő nem-krisztallográfiai elfordulás után az egyirányba forgó trigír szimmetriájú propellerek (5.19.b ábra) egymáshoz való viszonyát szimmetriacentrumok biztosítják. Az eredő oszlop-szimmetria  $C_{3i}$ . A *meta*-pozíció paritása miatt három egymást követő triazingyűrű triádot képez, amely a kiindulástól függetlenül két diádra (dimerre) bontható. Ezek különbsége az, hogy a hat halogénszubsztituens (3-IPOT esetében jódatomok)  $C_{3i}$  szimmetriával az egyik dimer (6-endo) belsejében helyezkedik el, a másik (6-exo) dimer üres. A 4-IPOT  $\rightarrow$  3-IPOT morfortrópiája tehát két egymást követő ( $180^\circ$ , ill.  $60^\circ$ -os) nem-krisztallográfiai elfordulás. Ebből következik, hogy az *R3c*, illetve  $\bar{R3}$  (148) tércsoportú morfortrópok izostrukturalitása harmadfokú.



5.19. ábra. Az  $R3c$  (161) tércsoportba tartozó 1,3,5-triazinszármazékok (pl. 4-IPOT) három szupramolekuláris (g) csúszósíkkal összetartott, a  $C_3$  tengely mentén oszlopot képező molekuláinak alapegysége, PU-diádjá (A). A 3-IPOT rácsa ( $R\bar{3}$ , 148) két virtuális nem-krisztallográfiai elfordulással 4-IPOT-ból ( $R3c$ , 161) állítható elő. Három-három propeller két  $C_{3i}$  szimmetriájú diádot (dimert) képez. A  $C_{3i}$  szimmetriájú oszlopban két, 6 jódatomot bezáró (endo) dimert egy üres (exo) dimer kapcsol össze (B). Két egymást követő endo-dimer egyikének a  $C_3$  tengelyre merőleges  $180^\circ$ -os elforgatása a kettőjük között egy homokirális  $D_3$  dimert eredményez. Új  $P\bar{3}c1$  (165) tércsoportban kristályosodik az izostrukturális 3-BrPOT és 3-CIPOT homológ (C)

4) A jódhoz képes kisebb térigényű szubsztituenseket hordozó, az izostrukturális mutató 3-BrPOT, 3-CIPOT és 3-MePOT<sup>112</sup> a hat szubsztituenset bezáró 6-endo diádok fenntartásával új tércsoportot ( $P\bar{3}c1$ ,

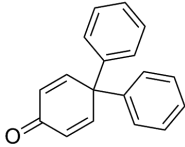
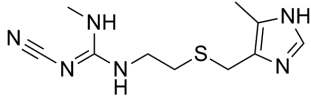
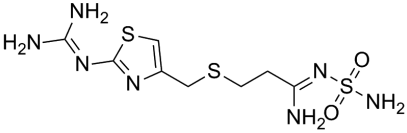
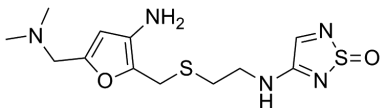
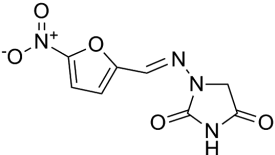
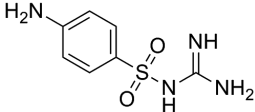
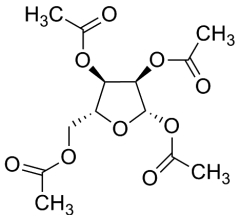
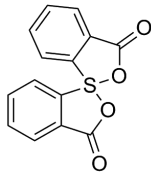
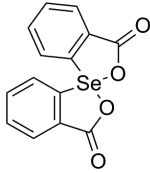
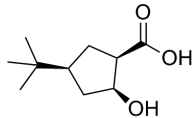
165) képeznek. Minden második 6-endo diád a megőrzött  $C_3$  tengelyre merőlegesen  $180^\circ$ -kal elfordul, így az álló és az elfordult  $C_{3i}$  szimmetriájú diádok között egy  $D_3$  szimmetriájú dimer alakul ki (5.19.c ábra), amelyet három  $60\text{-}60^\circ$ -ot bezáró digír tart össze. Mivel 3-IPOT és homológjai (Br, Cl) között csak egy nem-krisztallográfiai elfordulás létesít kapcsolatot, izostrukturalitásuk másodfokú. Viszont a másik izomerpár, 3-BrPOT és 4-BrPOT izostrukturalitása  $P\bar{3}c1$ , ill.  $R3c$  tércsoportbeli különbség mellett már csak negyedfokú.

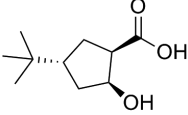
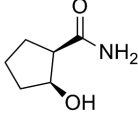
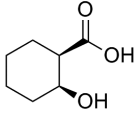
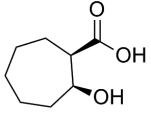
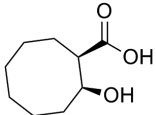
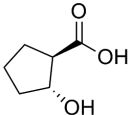
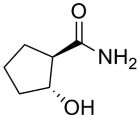
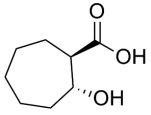
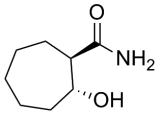
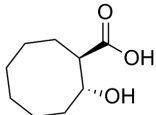
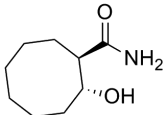
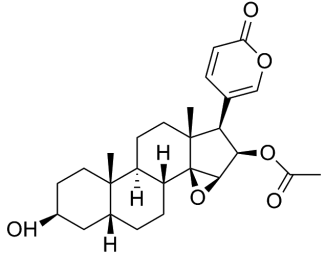
5) A háromfogású tengely (trigír) köré épülő 2,4,6-trisubsztituált-1,3,5-triazin származékok három elsőfokú izostrukturalitást mutató csoportba tömörülnek, amelyeket három egymást követő nem-krisztallográfiai elfordulás ( $180^\circ \rightarrow 60^\circ \rightarrow 180^\circ$ ) kapcsol össze. Ezek a felismerések megerősítik az izostrukturalitás és a morfotrópia közötti elválaszthatatlan kapcsolatot. Ennek lényege az, hogy a szoros illeszkedés mértékének szubsztitúció(k) okozta,  $60\%$  alá való csökkenését<sup>12</sup> nem-krisztallográfiai elfordulások (esetleg translációk) kompenzálják. Természetesen a morfotrópia virtuális nem-krisztallográfiai elfordulásokra való felbontásának, még korlátozottan merev molekulák esetében is, határt szab a szubsztituensek mérete és a molekulaszimmetria sérülése. Hasonlóképpen a polimorfoknál kimutatott valódi molekuláris nem-krisztallográfiai elfordulások is csak flexibilitásukban (belső forgásokban) korlátozott molekuláknál eredményezhetnek új módosulatokat.

#### 5.5.4. Kalixarének morfotrópiája

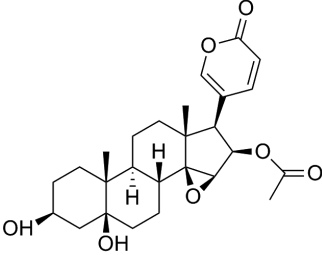
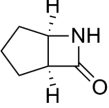
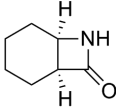
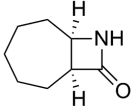
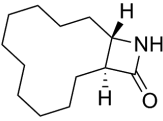
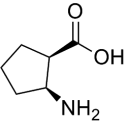
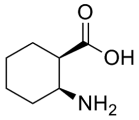
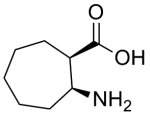
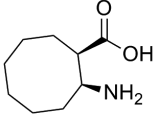
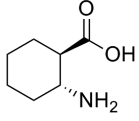
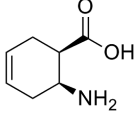
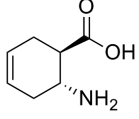
A közelmúltban az izostrukturalitást, és azzal kapcsolatban morfotrópiát mutató kristályszerkezetek gyűjtése és minősítése folytatódott. A fentebb részletesen tárgyalt 2,4,6-triariloxi-1,3,5-triazinok vizsgálatához hasonlóan, pl. kalixarének esetében<sup>116-118</sup> is, másodlagos kölcsönhatások finomhangolása által kiváltott morfotrópia volt felismerhető.

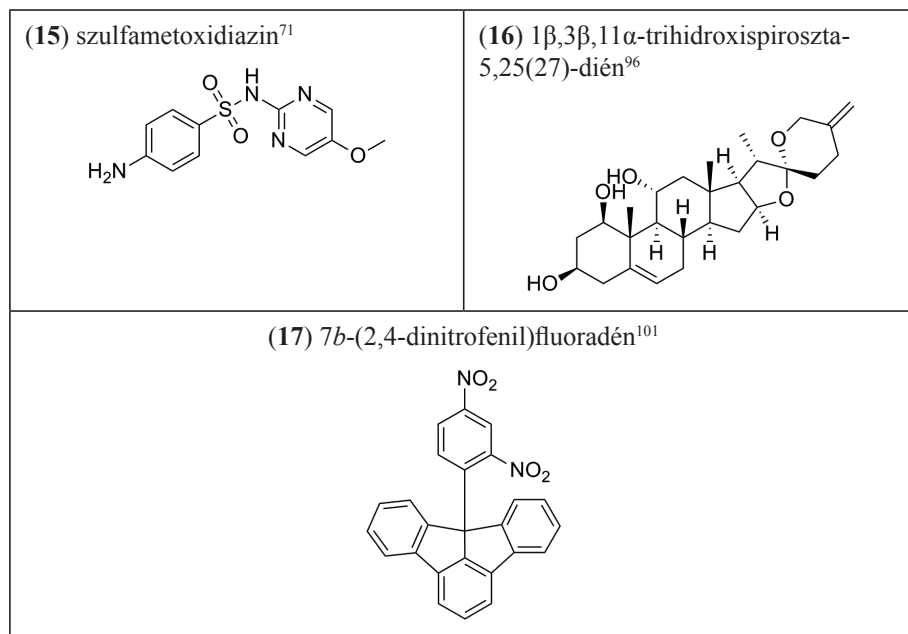
5.1. táblázat. A könyvfejezetben tárgyalt molekulák elnevezése és szerkezeti képlete

<p>(1) 4,4-difenil-2,5-ciklohexadienon<sup>27</sup></p> 	<p>(2) cimetidin<sup>32</sup></p> 
<p>(3) famotidin<sup>33</sup></p> 	<p>(4) [3-amino-4-[[2-[[[5-[(dimetilamino)metil]-2-furanil]metil]tio] etilamino]-1,2,5-tiadiazol-1-oxid]<sup>36</sup></p> 
<p>(5) nitrofurantoin<sup>42</sup></p> 	<p>(6) szulfaguanidin<sup>45,46</sup></p> 
<p>(7) 1,2,3,5-tetraacetil-β-D-ribofuranóz<sup>52,54</sup></p> 	<p>(8a) difenildiaciloxispiroszulfurán<sup>63</sup></p> 
<p>(8b) difenildiaciloxispiroszelenourán<sup>63</sup></p> 	<p>(9a)<sup>†</sup> (1<i>R</i>*,2<i>S</i>*,4<i>S</i>*)-4-<i>terc</i>-butil-2-hidroxiciklopentán-1-karbonsav<sup>76,77</sup></p> 

<p><b>(9b)</b> (1<i>R</i>*,2<i>S</i>*,4<i>R</i>*)-4-<i>terc</i>-butil-2-hidroxiciklopentán-1-karbonsav<sup>77</sup></p> 	<p><b>(c-10b)</b> <i>cisz</i>-2-hidroxiciklopentán-1-karboxamid<sup>76,77</sup></p> 
<p><b>(c-10c)</b> <i>cisz</i>-2-hidroxiciklohexán-1-karbonsav<sup>75</sup></p> 	<p><b>(c-10e)</b> <i>cisz</i>-2-hidroxicikloheptán-1-karbonsav<sup>75</sup></p> 
<p><b>(c-10g)</b> <i>cisz</i>-2-hidroxiciklooktán-1-karbonsav<sup>79</sup></p> 	<p><b>(t-10a)</b> <i>transz</i>-2-hidroxiciklopentán-1-karbonsav<sup>75</sup></p> 
<p><b>(t-10b)</b> <i>transz</i>-2-hidroxiciklopentán-1-karboxamid<sup>90</sup></p> 	<p><b>(t-10e)</b> <i>transz</i>-2-hidroxicikloheptán-1-karbonsav<sup>97</sup></p> 
<p><b>(t-10f)</b> <i>transz</i>-2-hidroxicikloheptán-1-karboxamid<sup>90</sup></p> 	<p><b>(t-10g)</b> <i>transz</i>-2-hidroxiciklooktán-1-karbonsav<sup>79</sup></p> 
<p><b>(t-10h)</b> <i>transz</i>-2-hidroxiciklooktán-1-karboxamid<sup>79</sup></p> 	<p><b>(11a)</b> cinobufagin<sup>82</sup></p> 



<p><b>(11b)</b> cinobufotalin<sup>82</sup></p> 	<p><b>(12a)</b> <i>cisz</i>-6-azabicyclo[3.2.0]heptán-7-on<sup>87</sup></p> 
<p><b>(12b)</b> <i>cisz</i>-7-azabicyclo[4.2.0]oktán-8-on<sup>88</sup></p> 	<p><b>(12c)</b> <i>cisz</i>-8-azabicyclo[5.2.0]nonán-9-on<sup>89</sup></p> 
<p><b>(12h)</b> <i>transz</i>-13-azabicyclo[10.2.0]tetradekán-14-on<sup>103</sup></p> 	<p><b>(c-13a)</b> <i>cisz</i>-2-aminociklopentán-1-karbonsav<sup>91</sup></p> 
<p><b>(c-13b)</b> <i>cisz</i>-2-aminociklohexán-1-karbonsav<sup>91</sup></p> 	<p><b>(c-13c)</b> <i>cisz</i>-2-aminocikloheptán-1-karbonsav<sup>91</sup></p> 
<p><b>(c-13d)</b> <i>cisz</i>-2-aminociklooktán-1-karbonsav<sup>91</sup></p> 	<p><b>(t-13b)</b> <i>transz</i>-2-aminociklohexán-1-karbonsav<sup>91</sup></p> 
<p><b>(c-14)</b> <i>cisz</i>-2-aminociklohex-4-én-1-karbonsav<sup>91</sup></p> 	<p><b>(t-14)</b> <i>transz</i>-2-aminociklohex-4-én-1-karbonsav<sup>91</sup></p> 



<sup>†</sup> A (c-10a), (c-10d), (c-10h), továbbá (t-10c) és (t-10d) a tárgyalásban nem szerepel.

## 5.6. Irodalom

1. Dunitz, J.D. *X-ray Analysis and the Structure of Organic Molecules*. Cornell University Press: Ithaka-London, **1979**.
2. Stout, G.H.; Jensen L.H. *X-ray Structure Determination A Practical Guide*. John Wiley& Sons: New York, **1989**.
3. Glusker, J. P.; Lewis, M.; Rossi, M. *Crystal Structure Analysis for Chemists and Biologists*. VCH Publishers: New York-Weinheim-Cambridge, **1994**.
4. Kálmán, A. *Kémiai krisztallográfia I*. ELTE egyetemi jegyzet: Budapest, **1981**.
5. Bényei, A.; Harmat, V. *Röntgendiffrakciós szerkezetvizsgálat*. Egyetemi jegyzet: Budapest-Debrecen, **2013**.
6. Friedrich, W.; Knipping, P.; Laue, M.; *Sitzungsber, Math. Phys. Kl. K. Bayer. Akad. Wiss.: München*, **1913**, pp. 303.
7. Schwarzenbach, D. *Acta Crystallogr.* **2012**, A68, 57.
8. Schmahl, W.W.; Steurer, W. *Acta Crystallogr.* **2012**, A68, 1.
9. Clegg, W. *Crystal Structure Determination*, Oxford University Press: Oxford, **1998**.
10. Faigel, Gy. *Mire jó a röntgenvonalzó? – Az atomi szerkezet meghatározása röntgensugárral*, Mindentudás Egyeteme, 6. kötet. Kossuth Kiadó: Budapest, **2006**, pp. 41.
11. Görbitz, C.H.; Hersleth, H.-P. *Acta Crystallogr.* **2000**, B56, 526.
12. Kitaigorodskii, A.I. *Organic Chemical Crystallography* Consultants Bureau: New York, **1961**.

13. *International Tables for X-ray Crystallography* **1962**. Vol. III. Kynoch Press: Birmingham.
14. Hauptmann, H.A. *The phase problem in X-ray Crystallography*. *Physics Today*, **1989**, *11*, 24.
15. Weeks, C.M.; Miller, R. *J. Appl. Cryst.* **1999**, *32*, 120.
16. Blow, D.M.; Rossmann, M.G. *Acta Crystallogr.* **1961**, *14*, 1951.
17. Oszlányi, G.; Sütő, A. *Acta Crystallogr.* **2005**, *A61*, 147.
18. Flack, H.D.; Bernardinelli, G. *Acta Crystallogr.* **1999**, *A55*, 908.
19. (a) Allen, F.H.; Motherwell, W. D. S. *Acta Crystallogr.* **2002**, *B58*, 407. (b) Allen, F. H. *Acta Crystallogr.* **2002**, *B58*, 553. Cambridge Structural Database (c), October **1999** issue (d) April **2003** issue CSD, Cambridge, UK.
20. Price, S.L. *Acta Crystallogr.* **2013**, *B69*, 313.
21. McCrone, W. C. *Physics and Chemistry of the Organic Solid State*, D. Fox, M. M. Labes, A. Weissberger, Eds. Interscience: New York, **1963**, Vol. 1, p. 725.
22. Kuhmert - Brandstätter, M.; Gasser, P. *Microchem. J.* **1971**, *16*, 419.
23. Haleblan J.; McCrone, W. C. *J. Pharm. Sci.* **1969**, *58*, 911.
24. Threlfall, T. L. *Analyst* **1995**, *120*, 2435.
25. Bernstein, J. *Polymorphism in Molecular Crystals*, Oxford Sci. Publ., Clarendon Press: Oxford, **2002**.
26. Bernstein, J. *Cryst. Growth Des.* **2005**, *5*, 1661.
27. Senthil Kumar, V. S.; Addlagatta, A.; Nangia, A.; Robinson, W. T.; Broder, C. K.; Mondal, R.; Ewans, I. R.; Howard, J. A. K.; Allen, F. H. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, 3848.
28. Dunitz, J. J. *Chem. Commun.* **2003**, 545.
29. Desiraju, G. R. *Angew. Chem. Int. Ed. Eng.* **1995**, *34*, 2311.
30. Desiraju, G. R. *Science*, **1997**, *278*, 404.
31. Yu, L. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 6380.
32. Hegedüs, B.; Görög, S. *J. Pharm. & Biomed. Anal.* **1985**, *3*, 303.
33. Hegedüs, B.; Bod, P.; Harsányi, K.; Péter, I.; Kálmán, A.; Párkányi, L. *J. Pharm. & Biomed. Anal.* **1989**, *7*, 563.
34. Ferenczy, G. G.; Párkányi, L.; Ángyán, J. G.; Kálmán, A.; Hegedüs, B. *J. Mol. Struct. (Theochem)* **2000**, *503*, 73, and references therein.
35. Kojic-Prodic, B.; Ruzic-Toros, Z., Bresciani-Pahor, N.; Randaccio, L. *Acta Crystallogr.* **1980**, *B36*, 1223.
36. Lumma, Jr, W. C.; Anderson, P. S.; Baldwin, J. J.; Bolhofer, W. A.; Habecker, C. N.; Hirschfield, J. M.; Pietruszkiewicz, A. M.; Randall, W. C.; Torchiana, M. L.; Britcher, S. F.; Clineschmidt, B. V.; Denny, G. H.; Hirschmann, R.; Hoffman, J. M.; Phillips, B. T.; Streeter, K. B. *J. Med. Chem.* **1982**, *25*, 207.
37. Jauregui, E. A.; Estrada, M. R.; Mayorga, L. S.; Ciuffo, G. M.; Ibarz, R. R.; Santillan, M. B. *J. Mol. Struct.* **1981**, *72*, 183.
38. Lumma, Jr, W. C.; Baldwin, J. J.; Bicking, J. B.; Bolhofer, W. A.; Hoffman, J. M.; Phillips, B. T.; Robb, C. M.; Torchiana, M. L.; Schlegel, H. B.; Smith, G. M.; Hirschfield, J. M.; Snyder, J. P.; Springer, J. P. *J. Med. Chem.* **1984**, *27*, 1047.
39. Hädicke, E.; Frickel, F.; Franke, A. *Chem. Ber.* **1978**, *111*, 3222.
40. Párkányi, L.; Kálmán, A.; Hegedüs, B.; Harsányi, K.; Kreidl, J. *Acta Crystallogr.* **1984**, *C40*, 676.
41. Boström, J.; Norrby, P-O.; Liljefors, T. J. *Comput.-Aided Mol. Des.* **1998**, *12*, 383.
42. Pienaar, E. W.; Caira, M. R.; Lötter, A. P. *J. Cryst. Spectr. Res.* **1990**, *23*, 785.

43. Pienaar, E. W.; Caira, M. R.; Lötter, A. P. *J. Cryst. Spectr. Res.* **1990**, *23*, 739.
44. Caira, M. R.; Pienaar, E. W.; Lötter, A. P. *Mol. Cryst. Liq. Cryst.* **1996**, 214.
45. Alleaume, M.; Gulko, A.; Herbstein, F. H.; Kapon, M.; Marsh, R. E. *Acta Crystallogr.* **1976**, *B32*, 669.
46. Kálmán, A.; Czugler, M.; Argay, Gy. *Acta Crystallogr.* **1981**, *B37*, 868.
47. Zorky, P. M.; Razumaeva, A. E.; Belsky, V. K. *Acta Crystallogr.* **1977**, *A33*, 1001.
48. Davoll, J.; Brown, G. B.; Visser, D. W. *Nature* (London), **1952**, *170*, 64.
49. Patterson, A. L.; Groshens, B. P. *Nature* (London), **1954**, *173*, 398.
50. James, V. J.; Stevens, J. D. *Cryst. Struct. Commun.* **1973**, *2*, 609.
51. Poppleton, B. J. *Acta Crystallogr.* **1976**, *B32*, 2702.
52. Czugler, M.; Kálmán, A.; Kovács, J.; Pintér, I. *Acta Crystallogr.* **1981**, *B37*, 172.
53. Dunitz, J. D.; Bernstein, J. *Acc. Chem. Res.* **1995**, *28*, 193.
54. Bombicz, P.; Czugler, M.; Tellgren, R., Kálmán, A. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, *42*, 1957.
55. Dunitz, J. D.; Gavezotti, A. *Acc. Chem. Res.* **1999**, *32*, 677.
56. Bar, I.; Bernstein, J. *Tetrahedron* **1987**, *43*, 1299.
57. Kálmán, A.; Párkányi, L.; Argay, Gy. *Acta Crystallogr.* **1993**, *B49*, 1039.
58. Kobayashi, K. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **2003**, *76*, 247.
59. Náray-Szabó, I. *Kristálykémia*, Akadémiai Kiadó: Budapest, **1965**.
60. Wells, A. F. *Structural Inorganic Chemistry*, Clarendon Press: Oxford, **1962**.
61. Bloss, F. D. *Crystallography and Crystal Chemistry*, Holt, Rinehart & Winston, Inc.: New York, **1971**.
62. Lima-de-Faria, J.; Heller, E.; Liebau, F.; Makovicky, E.; Parthé, E. *Acta Crystallogr.* **1990**, *A46*, 1.
63. Kálmán, A.; Párkányi, L.; Argay, Gy. *Acta Chim. Hung.* **1993**, *130*, 279.
64. Holczbauer, T.; Fábián, L., Csomós, P., Fodor, L., Kálmán, A. *CrystEngComm.* **2010**, *12*, 1712.
65. Kálmán, A.; Argay, Gy.; Ribár, B.; Vladimirov, S.; Zivanov-Stakic, D. *Croat. Chim. Acta* **1984**, *57*, 519.
66. Karle, I. L.; Karle, J. *Acta Crystallogr.* **1969**, *B25*, 434.
67. Kálmán, A.; Argay, Gy.; Scharfenberg-Pfeifer, D.; Höhne, E. Ribár, B. *Acta Crystallogr.* **1991**, *B47*, 68.
68. Kálmán, A.; Argay, Gy.; Zivanov-Stakic, D., Vladimirov, S.; Ribár, B. *Acta Crystallogr.* **1992**, *B48*, 812.
69. Kálmán, A. in *Fundamental Principles of Molecular Modeling*; Gans, W.; Ammon, A.; Boeyens, J. C. A., Eds.; Plenum Press: New York, **1996**, pp. 209.
70. Kálmán, A.; Párkányi, L. in *Advances in Molecular Structure Research*, Hargittai, M.; Hargittai, I., Eds.; JAI Press: Greenwich, CT, **1997**, *3*, 189.
71. Caira, M. R.; Mohamed, R. *Supramol Chem.* **1993**, *2*, 201.
72. Ung, A. T.; Bishop, R.; Craig, D. C.; Dance, I. G.; Scudder, M. L. *Chem. Mater.* **1994**, *6*, 1269.
73. Fábián, L.; Kálmán, A. *Acta Crystallogr.* **1999**, *B55*, 1099.
74. Löwdin, P.-O. *J. Chem. Phys.* **1950**, *18*, 365.
75. Kálmán, A.; Fábián, L.; Argay, Gy.; Bernáth, G.; Gyarmati, Zs. *Acta Crystallogr.* **2002**, *B58*, 494.
76. Kálmán, A.; Fábián, L.; Argay, Gy. *Chem. Commun.* **2000**, 2255.
77. Kálmán, A.; Argay, Gy.; Fábián, L.; Bernáth, G.; Fülöp, F. *Acta Crystallogr.* **2001**, *B57*, 539.

78. Nangia, A.; Desiraju, G.R. *Acta Crystallogr.* **1998**, *A54*, 934.
79. Kálmán, A.; Fábián, L.; Argay, Gy.; Bernáth, G.; Gyarmati, Zs. *Acta Crystallogr.* **2002**, *B58*, 855.
80. Olszak, T. A.; Peeters, O. M.; Blaton, N. M.; de Ranter, C. J. *Acta Crystallogr.* **1971**, *C50*, 761.
81. Kálmán, A.; Fábián, L.; Argay, Gy. *Abst. of the 19<sup>th</sup> Eur. Cryst. Meeting*, **1999**, Nancy, 25-31 August, p. 327.
82. Kálmán, A.; Fülöp, V.; Argay, Gy.; Ribár, B.; Lazar, D.; Živanov-Stakić, D., Vladimirov, S. *Acta Crystallogr.* **1988**, *C44* 1634.
83. Prasad, L.; Grabe, E. J. *Acta Crystallogr.* **1983**, *C39*, 273.
84. Messerschmidt, A.; Höhne, E.; Megges, R. *Cryst. Struct. Commun.* **1981**, *10*, 149.
85. (a) Groth, P. *Berichte, chem. Ges.* **1870**, *3*, 449, (b) Groth, P. H. R. *An introduction to chemical crystallography*, Gurney & Jackson: London, **1906**, pp 36.
86. Brock, C. P.; Dunitz, J. D. *Chem. Matter.* **1994**, *6*, 1118.
87. Reck, G.; Huml, K.; Symersky, J. *Acta Crystallogr.* **1990**, *C46*, 720.
88. Argay, Gy.; Fábián, L.; Kálmán, A.; Bernáth, G.; Gyarmati, Zs. *Cs. Acta Crystallogr.* **2004**, *E60*, 170.
89. Argay, Gy.; Kálmán, A.; Bernáth, G.; Gyarmati, Zs. *Cs. Acta Crystallogr.* **2004**, *E60*, 173.
90. Kálmán, A.; Fábián, L.; Argay, Gy.; Bernáth, G.; Gyarmati, Zs. *Acta Crystallogr.* **2004**, *B60*, 755.
91. Fábián, L.; Kálmán, A.; Argay, Gy.; Bernáth, G.; Gyarmati, Zs. *Cs. Cryst. Growth Des.* **2005**, *5*, 773.
92. Caira, M. R. in *Encyclopedia of Supramolecular Chemistry*, M. Dekker, Inc.: New York, **2004**, pp 767.
93. Fábián, L.; Kálmán, A. *Acta Crystallogr.* **2004**, *B60*, 547.
94. Kálmán, A.; Argay, Gy.; Ribár, B.; Zivanov-Stakić, D.; Vladimirov, S. *Acta Crystallogr.* **1985**, *C41*, 1645.
95. Argay, Gy.; Kálmán, A.; Zivanov-Stakić, D.; Vladimirov, S.; Ribár, B. *Acta Chim. Hung.* **1998**, *135*, 449.
96. Fábián, L.; Argay, Gy.; Kálmán, A. *Acta Crystallogr.* **1999**, *B55*, 788.
97. Kálmán, A.; Fábián, L.; Argay, Gy.; Bernáth, G.; Gyarmati, Zs. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 34.
98. Etter, M. C. *Acc. Chem. Res.* **1990**, *23*, 120.
99. Bernstein, J.; Davis, R. E.; Shimon, L.; Chang, N.-L. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1995**, *34*, 1555.
100. Jeffrey, G. A.; Saenger, W. *Hydrogen Bonding in Biological Structures*, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, **1991**
101. Xia, A.; Selegue, J. P.; Carrillo, A.; Patrick, B. O.; Parkin, S.; Brock, C. P. *Acta Crystallogr.* **2001**, *B57*, 507.
102. Schneer, C. J. *Acta Crystallogr.* **1955**, *8*, 279.
103. Fábián, L.; Kálmán, A.; Argay, Gy.; Bernáth, G.; Cs. Gyarmati, Zs. *Chem. Commun.* **2004**, 2114.
104. Kálmán, A. *Acta Crystallogr.* **2005**, *B61*, 536.
105. Pandarese, F.; Ungaretti, L.; Coda, A. *Acta Crystallogr.* **1975**, *B31*, 2671.
106. Hamzaoui, F.; Baert, F.; Wojcik, G. *Acta Crystallogr.* **1996**, *B52*, 159.
107. Kálmán, A.; Fábián, L. *Acta Crystallogr.* **2007**, *B63*, 411.

108. Jessiman, A. S.; MacNicol, D. D.; Mallinson, P. R.; Wallace, I.; *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1990**, 1619.
109. Fábíán, L.; Bombicz, P.; Czugler, M.; Kálmán, A.; Weber, E.; Hecker, M. *Supramol. Chem.* **1999**, *11*, 151.
110. Zimmermann, H.; Bürzlaff, H. *Z. Krist.* **1985**, *170*, 241.
111. Reichenbacher, K.; Süß, H. I.; Stoeckli-Evans, H.; Bracco, S.; Sozzani, P.; Weber, E.; Hullinger, J. *New J. Chem.* **2004**, *28*, 393.
112. Thalladi, V. R.; Brasselet, S.; Weiss, H. C.; Bläser, D.; Katz, A. K.; Carrell, H. L.; Boese, R.; Zyss, J.; Nangia, A.; Desiraju, G. R. *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 2563.
113. Saha, B. K.; Aitipamula, S.; Banerjee, R.; Nangia, A.; Jetti, R. K. R.; Boese, R.; Lam, C.-K.; Mak T. C. *Mol. Cryst. Liq. Cryst.* **2005**, *440*, 295.
114. Boese, R.; Desiraju, G. R.; Jetti, R. K. R.; Kirchner, M. T.; Ledoux, I.; Thalladi, V. R.; Zyss, J. *Struct. Chem.* **2002**, *13*, 321.
115. Bombicz, P.; Kálmán, A. *Cryst. Growth Des.* **2008**, *8*, 2821.
116. Gruber, T.; Weber, E.; Fischer, C.; Seichter, W.; Bombicz, P.; Csöreg, I. *Supramolecular Chemistry* **2006**, *18*, 537.
117. Gruber, T.; Fischer, C.; Seichter, W.; Bombicz, P.; Weber, E.; *CrystEngComm.* **2011**, *13* 1422.
118. Bombicz, P.; Gruber, T.; Fischer, C.; Weber, E.; Kálmán, A. *CrystEngComm.* **2014**, *16*, 3646.

## 6. Atomabszorpciós spektrometria

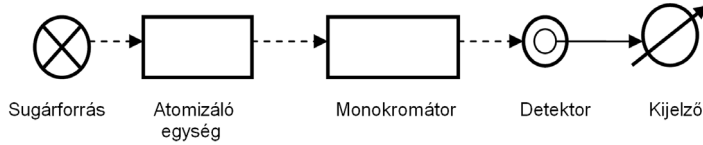
*Kékedy-Nagy László*

Az atomabszorpciós spektrometria (AAS) az elemanalitika egyik legelterjedtebb, alapvető módszere, széleskörű alkalmazását az eljárás gyorsasága, pontossága, nagy érzékenysége, könnyű kezelhetősége és olcsósága biztosítja.

Az atomabszorpció jelensége a természetben régóta ismeretes. Először W. Wollaston 1802-ben figyelte meg, hogy a Nap színeképében fekete vonalak észlelhetők. J. Fraunhofer 1815-től részletesen vizsgálta a Nap színeképében e fekete vonalakat, pontosan meghatározva a vonalak hullámhosszát. Munkássága elismerésül ezeket a vonalakat Fraunhofer-vonalaknak nevezzük. A jelenség magyarázatát 1820-ban D. Brewster adta meg először, szerinte a Fraunhofer-vonalak a Nap atmoszférájában végbemenő fényabszorpció következményei. Az elméleti áttörést G. Kirchhoff 1859-ben és R. Bunsennel 1860-ban megjelent közös cikke jelentették.<sup>1,2</sup> Ők adták meg a spektrumra vonatkozó ismeretek értelmezését: ha gázok vagy gőzök atomjaival energiát közlünk, akkor azok a rájuk jellemző vonalas spektrumot bocsátják ki. Ugyanezek az atomok viszont képesek a kibocsátott fény hullámhosszával egyező hullámhosszú fényt elnyelni, abszorbeálni. Ezért jelennek meg izzó anyagok által kibocsátott folytonos színeképben (például a Nap) fekete abszorpciós vonalak. E jelenség alapján fedezte fel 1870-ben N. Lockyer a Nap színeképében a periódusos rendszer második elemét, a héliumot (Helios – görögül Nap). Analitikai célokra az eljárást csupán 1955-ben vezették be az ausztrál A. Walsh,<sup>3</sup> valamint a holland J. Alkemade és W. Milatz<sup>4</sup> javaslatára. A közel 100 éves késésnek az oka az igen kis (0,001 nm) félérték-szélességű vonalakat kibocsátó spektrállámpa, mint megvilágító fényforrás hiánya volt.

Az AAS-eljárás során a mintát magas hőmérsékleten szabad atomokká alakítják, melyeket a vizsgálandó elemre jellemző hullámhosszú monokromatikus elektromágneses sugárzással (EMS) besugározzák. Az alapállapotban levő atomok a gerjesztési energiának megfelelő hullámhosszúságú EMS-t elnyelik, hatására gerjesztődnek. Ennek következményeként a lánгон áthaladt sugárzó energia mennyisége lecsökken. Mérjük a sugárzó energia nagyságát, pontosabban annak csökkenését. A jelenség teljesen analóg a folyadékok UV-VIS tartományban történő elnyelésével, azzal a különbséggel, hogy az alkotó jelen esetben atomi állapotban van. A szabad atomokat a forró közeg hozza létre és tartja fenn, a mérőcella is maga a közeg. A forró közeg lehet láng (FAAS) vagy

pedig elektromos áram segítségével felfűtött grafitcső (kályha, kemence) (GFAAS). Az AAS-eljárás elvi vázлата a 6.1. ábrán látható.



6.1. ábra. Az atomabszorpciós eljárás elvi vázлата

## 6.1. A szabad atomok fényelnyelése, az AAS alapösszefüggései

Az atomabszorpció esetében is érvényes a Bouguer–Lambert–Beer (BLB) törvény:

$$A = k_0 b C, \quad (6.1)$$

ahol  $A$  az abszorbancia,  $k_0$  az atomabszorpciós koefficiens,  $b$  az elnyelő réteg vastagsága,  $C$  a koncentráció. A mért fényelnyelés és az abszorbancia között a következő összefüggés áll fenn:

$$A = -\log T = \log \frac{I_0}{I} \quad \text{és} \quad T = \frac{I}{I_0}, \quad (6.2)$$

ahol  $T$  a transzmittancia (átbocsátó képesség),  $I_0$  a beeső fény intenzitása,  $I$  a fény intenzitása elnyelés után. Az atomabszorpciós koefficiens értékét, figyelembe véve az atomi vonal természetes kiszélesedését, a Boltzmann–Einstein-egyenlet adja meg:

$$k_0 = \frac{N_0 A_{n0} \pi e^2}{m c^2}, \quad (6.3)$$

ahol  $N_0$  a térfogategységben az alapállapotban levő atomok száma,  $A_{n0}$  az Einstein-féle spontán emissziós valószínűségi együttható,  $e$  az elektron töltése,  $m$  az elektron tömege,  $c$  a fény terjedési sebessége vákuumban. Feltételezve, hogy az atomi vonal kiszélesedéséhez a lágban csak a Doppler-effektus járul hozzá (lásd 6.2. alfejezet), akkor a  $k_0$ -t kifejező egyenlet a következőképpen módosul:

$$k_0 = 0,939 \left( \frac{\lambda_0^2}{\Delta \lambda_D} \right) N_0 A_{n0} \frac{\pi e^2}{m c^2}, \quad (6.4)$$



ahol  $\lambda_0$  a vonalintenzitás maximumának a hullámhossza,  $\Delta\lambda_D$  a vonalkiszélesedés értéke a Doppler-effektus következtében. Az atomok által elnyelt fény mennyisége ( $I_{\text{absz}}$ ):

$$I_{\text{absz}} = I_0 - I = (1 - e^{-k_0 b}). \quad (6.5)$$

Ha az  $e^{-k_0 b}$  tagot sorba fejtsük és a magasabb tagokat elhanyagoljuk,  $I_0 (1 - e^{-k_0 b}) \approx I_0 k_0 b$ -vel egyenlő. Behelyettesítve a  $k_0$ -t a (6.4) egyenletből, az elnyelt fény mennyisége:

$$I_{\text{absz}} = I_0 N_0 A_{n0} b \frac{\pi e^2}{m c^2}. \quad (6.6)$$

A (6.6) egyenletből látható, hogy az elnyelt fény mennyisége egyenesen arányos a beeső EMS intenzitásával, az elnyelő atomok számával, valamint az elnyelő réteg vastagságával, de független a közeg (pl. a lág) hőmérsékletétől, valamint az atomok gerjesztési energiájától. A lág hőmérsékletén, kb. 3000 K-ig, az atomok nagy része alapállapotban van, csak nagyon kis,  $10^{-2}$ - $10^{-12}$  %-a gerjesztődik. Ebből adódik az AAS másik előnye az emissziós módszerrel, a lángfotometriával szemben, hogy érzékenysége 2-3 nagyságrenddel nagyobb az utóbbinál, a kimutatási határ így a legtöbb fém esetében 0,1-1  $\mu\text{g/L}$  nagyságrendű.

## 6.2. Az atomi vonalak szélessége

Ha egy atom elektronjai a megengedett legkisebb kvantumszámokkal kifejezett állapotban vannak, akkor az elektronok energiája minimális, az atom alapállapotban van. Ezen energiaszint gerjesztési energiája ( $E_p$ ) zérus, a gerjesztési energiát pedig ettől az értéktől számítják. Minden atomfajta elektronjai az azt jellemző energiával, valamint energiaátmenettel rendelkeznek, ezért a kibocsátott és elnyelt EMS frekvenciája is egy adott atomfajtára jellemző. Habár az energiaátmenetek egy adott atomfajta esetében fix értékek, az ezeknek megfelelő atomi vonalak szélessége nem egyenlő nullával, hanem annál nagyobb. A Heisenberg-féle bizonytalansági elv alapján valamely energiaszint szélessége ( $\Delta E$ ) fordítottan arányos annak időtartamával ( $t$ ). Mivel az atom alapállapotban van, annak időtartama végtelen, ezért a  $\Delta E$ , valamint az EMS  $\Delta\nu$ -értéke kizárólag a gerjesztett állapot időtartamának függvénye:

$$\Delta E \geq \frac{h 2\pi}{\Delta t}, \quad (6.7)$$

$$\Delta \nu = \frac{1}{2\pi \Delta t} . \quad (6.8)$$

A hullámhossztartomány, melyben a spektrumvonal megjelenik harang alakú Gauss-görbe formájában, a *természetes kiszélesedést* ( $\Delta\lambda_T$ ) jelenti:

$$\Delta\lambda_T = \frac{\lambda_0^2}{2\pi ct} . \quad (6.9)$$

A gerjesztett állapot élettartama  $10^{-7}$ - $10^{-10}$  s, a természetes kiszélesedés ebből adódóan  $10^{-5}$  nm nagyságrendű. A valóságban a spektrumvonalak jóval szélesebbek, melynek több oka van, ezek közül a legjelentősebbeket az alábbiakban tárgyaljuk.

A *Doppler-kiszélesedés* ( $\Delta\lambda_D$ ) a részecskék hőmozgásából adódik. A jelenség a hangtanból ismert Doppler-jelenséggel analóg: a részecske az EMS kibocsátása közben a detektorhoz képest elmozdul. Mivel a részecskék hőmozgását egy harang alakú, szimmetrikus görbe írja le, a kiszélesedés is szimmetrikus, nagysága a hőmérséklettől és a részecske tömegétől ( $M$ ) függ:

$$\Delta\lambda_D = 7,16 \cdot 10^{-7} \lambda_0 \left( \frac{T}{M} \right)^{1/2} . \quad (6.10)$$

Ezen kiszélesedés mértéke  $10^{-2}$ - $10^{-3}$  nm nagyságrendű.

A *Lorentz-kiszélesedés* vagy *nyomáskiszélesedés* abból adódik, hogy az atomok elektronpályája más atomokkal ütközve deformálódik, valamint az ütközések csökkentik a gerjesztési szintek élettartamát. A kiszélesedés aszimmetrikus (a nagyobb hullámhossz felé nő), ugyanakkor a  $\lambda_0$  is eltolódik a nagyobb hullámhosszak felé.

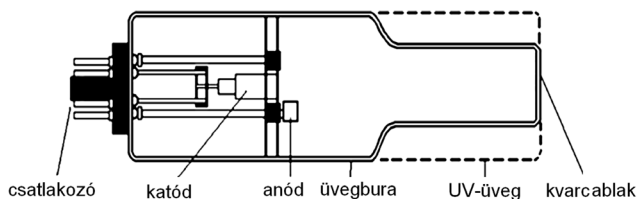
A *Stark-kiszélesedés* abból adódik, hogy homogén elektromos erőterben a diszkrét vonalak felhasadnak, a felhasadás mértéke az elektromos erőter nagyságával és a gáz nyomásával arányos.

A vonalkiszélesedés az emissziós és abszorpciós vonalakra egyaránt érvényes. Ahhoz, hogy mérhető elnyelést kapjunk, a sugárforrás és az elnyelési vonal azonos sáv szélességű ( $\sim 0,001$  nm) kell, hogy legyen.

### 6.3. Atomabszorpciós spektrofotométerek

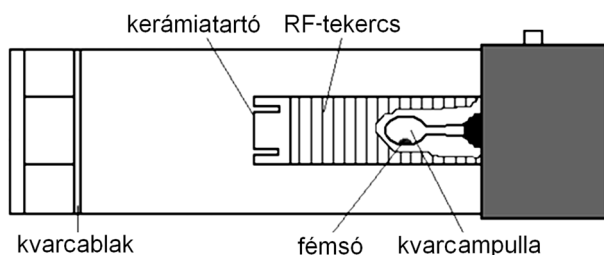
Az atomabszorpciós spektrofotométer felépítését vázlatosan a 6.1. ábra szemlélteti.

*Sugárforrásként* az erre a célra kifejlesztett vonalas spektrumú (0,0001 nm félértékszélesség-nagyságrendű) sugárforrásokat alkalmaznak: a vajtkatód-lámpát (más néven üreghatód-lámpát) és az elektródnélküli kisülési lámpát. A *vajtkatód-lámpa* zárt térben, nemesgáz atmoszférában (Ar vagy Ne), alacsony nyomáson (10-1000 Pa) működő gázkisülési cső. A lámpákat 100-300 volt egyenfeszültségen üzemeltetik, a fűtőáram nagysága általában 5-20 mA. A katód egy 4-5 mm átmérőjű furattal ellátott, egyik végén zárt henger, anyaga a meghatározandó fémből vagy annak egy ötvözetéből készül. Az anód W-ból készült gyűrű, mely a katódüreg előtt található (6.2. ábra).



6.2. ábra. A vajtkatód-lámpa szerkezete<sup>9</sup>

A kisülés során a katód anyagából kilökődő fématomok a gőztérben a nemesgázionokkal ütközve gerjesztődnek, így a lámpa egyrészt a katód elemének, másrészt a töltőgáznak megfelelő hullámhosszakon sugároz. Az üreghatód-sugárforrás előnyei: egyszerű felépítés, stabil működés, hosszú élettartam, kismértékű vonalkiszélesedés, nagy vonalintenzitás. Hátránya, hogy minden egyes elemhez külön lámpát kell használni. Az *elektródnélküli kisülési lámpa* (EDL) egy RF-val táplált kisülési cső (6.3. ábra).



6.3. ábra. Az elektródnélküli kisülési lámpa szerkezete<sup>9</sup>

A meghatározandó elem vagy annak egy illékony sója (jodid) egy  $\sim 1$  cm átmérőjű zárt kvarccsőben, semleges atmoszférában, néhány torr nyomáson található. A kvarccső köré egy mikrohullámú generátor antennáját tekerccselik. A mikrohullámok hatására a fém vagy a vegyület

elpárolog, disszociál, a fématomok pedig gerjesztődnek és a fémre jellemző rezonanciavonalakat sugározzák ki. E sugárforrás előnye abban rejlik, hogy keskeny, nagyintenzitású vonalakat sugároz, amelyek intenzitása 1-2 nagyságrenddel nagyobb, mint az üreghatód-sugárforrásé. Hátrányaként említhető pedig az időbeni kis stabilitás, a bonyolult felépítés, továbbá az, hogy csak néhány, illékony elemre (pl. As, Sb, Cd, Hg, Bi) készíthető el.

A láng előállítására és a minta bevitelére szolgáló egységben a lángot két gáz összekeverésével és a gázelegy meggyújtásával állítják elő. Tüzelőanyagként leggyakrabban  $C_2H_2$ -t és PB-gázt használnak, oxidálószerként pedig levegőt,  $O_2$ -t vagy  $N_2O$ -ot. Az AAS-spektrométerek előkevert, lamináris lángot használnak. A folyékony mintát finoman elporlasztott aeroszol formájában juttatják a lángba pneumatikus, ultrahangos vagy hidraulikus nagynyomású porlasztó segítségével. A *pneumatikus porlasztó* két koncentrikus csőből áll, porlasztógázként a láng előállításához szükséges oxidálószerrel használja. A porlasztóban a gáz egy csökkenő átmérőjű csőben felgyorsul, és hangsebességgel hagyja el a cső végét. Ezután hirtelen kiterjed, és áramlási sebessége lecsökken. A kiterjedő gázáramba helyezett kapilláriscső végén szívóhatás lép fel, ezért a kapilláris másik végét folyadékba mártva a folyadék benne felemelkedik egészen annak a végéig. Mivel a gáz a kapilláris cső körül turbulens áramlással áramlik, a nyomáshullámok hatására a kapilláris végétől, a folyadékoszlop felületéről apró, 5-50  $\mu m$  átmérőjű cseppek válnak le. A cseppek a gázáramba bekerülnek és a gáz áramlási sebességére gyorsulnak fel. A gyorsulás és az ütközések hatására a cseppek tovább aprózódnak, és létrejön egy finom aeroszolpermet, amelynek egy része (5-10%-a) a lángba kerül. A pneumatikus porlasztás előnyei: a porlasztó egyszerű felépítésű, a porlasztás egyenletes és reprodukálható, folytonos a működés, továbbá könnyen adaptálható eltérő fizikai tulajdonságú mintákhoz. Hátrányai közé tartozik az, hogy az aeroszol koncentrációja kicsi, illetve a cseppek mérete széles határok között változik. Az *ultrahangos porlasztónál* a mintát kis áramlási sebességgel (0,2-0,5 mL/perc) egy zárt térben, ultrahanggal rezgő (500 kHz fölött) kristályra viszik. A rezgések hatására finom köd (aeroszol) keletkezik a kristály felett, melyet általában egy kishozamú (0,5-1 L/perc) Ar- vagy  $N_2$ -gázárammal egyenesen a lángba vezetik. Az ultrahangos porlasztás előnyei: nagy koncentrációjú, egyenletes és kis cseppméretű aeroszol előállítása (a porlasztási hatásfok elérheti a 25-30%-ot, a cseppek átlagátmérője  $< 5 \mu m$ ); hátránya viszont a bonyolult felépítés és üzemeltetés. A lángban való optikai út növelése céljából az égőfejben egy 50-100 mm hosszú, 0,1-0,5 mm széles rés (egy esetben 3 párhuzamos rés) található, melyen a gázelegy kiáramlik.

*Fényfelbontó egységként* közepes felbontóképességű (spektrális sávszélessége  $\sim 0,1$  nm) rácsos monokromátort alkalmaznak.

A *detektor* ezen berendezésekben UV-VIS spektrumtartományban érzékenyített fényelektron-sokszorozó, újabban CCD-detektor.

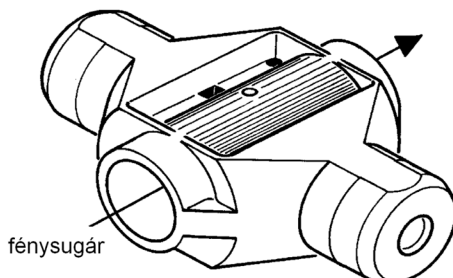
A *kijelző* leggyakrabban digitális. Az AAS-készülékek célszámítógéppel vannak összekapcsolva, az eredmény kijelzése pedig a számítógép monitorján jelenik meg.

## 6.4. Lángnélküli, elektrotermikus atomizálás

Az elektrotermikus atomizálás (ETAAS) során a minta kis térfogatát (5-20  $\mu\text{L}$ ) egy elektromosan felfűthető grafitcsőbe, szénrúdra vagy fémszállra helyezik (atomizátor), majd az atomizátort 2000-2400 K-re felfűtik. A magas hőmérséklet hatására a minta elpárolog, szabad atomokra disszociál. Az atomgőzöket egy üregkatódos sugárforrással átvilágítják és mérik az atomgőzön áthaladt sugárzó energia csökkenését. Az elektrotermikus atomizátorokban a minta átlagos tartózkodási ideje a magas hőmérsékleten sokkal nagyobb, mint a lángokban (elérheti az 1 s-et is), ezért az atomizálás csaknem teljes. Általános előnyük a nagy érzékenység (1-3 nagyságrenddel nagyobb, mint a lángban), az alacsony kimutatási határ (a legtöbb fém esetében  $10^{-10}$ - $10^{-15}$  g), a kis oldattérfogat-szükséglet (5-20  $\mu\text{L}$ ), a szilárd minták analizálhatók előkezelés és feltárás nélkül, illetve az alacsony zajszint. Hátrányukként említhető, hogy a szabad atomok koncentrációja csak rövid ideig, néhány másodpercig, tartható fenn (a lángban folyamatosan), szakaszos a működésük, rövid az élettartamuk (100-150 felfűtés után az atomizátort cserélni kell), továbbá a meghatározások pontossága kisebb, mint lángokban (5-10%). Az eljárást először B. V. L'vov javasolta 1959-ben,<sup>5</sup> a gyakorlatban a H. Massmann által kifejlesztett kemence terjedt el.<sup>6</sup> A kemence 40-80 mm hosszú, 4-8 mm belső átmérőjű spektrális tisztaságú grafitcső, amelynek a két vége vízzel hűtött grafitgyűrűk közé van befogva. Az áramforrás a grafitgyűrűkhöz csatlakozik (hosszanti fűtés), emiatt a cső hosszában melegítéskor hőmérsékleti gradiens alakul ki. Az izoterm körülmények úgy valósítók meg, hogy a grafit kontaktusokat a cső hosszában helyezik el, így a fűtés egyenletes, a megvilágítás irányával merőleges irányú (keresztfűtés) (6.4. ábra).

Az atomizátor zárt térben, semleges gáz ( $\text{Ar}$ ,  $\text{N}_2$ ) atmoszférájában található, hogy a grafit elégését megakadályozzák. A grafitcső közepén levő 3-5 mm átmérőjű furaton keresztül a mintaoldatot a cső belső falára

pipettázzák. Újabbán a grafitcsőbe pirolitikus grafittal bevont grafitlapot helyeznek, melyre a mintaoldatot pipettázzák (L'vov-platform), így a minta kizárólag hőszugárzás révén melegszik fel, a csőhöz és az öblítőgázhoz képest időben késeltetve. A minta párolgása emiatt a maximális hőmérsékletű térben izoterm körülmények között gyors, veszteségmentes. Az ürekatód-sugárforrás EMS-a a cső középvonalán halad át. A kemence felfűtése több, különböző időtartamú lépésekben, programozottan történik, a minta összetételének és az alkotó természetének függvényében. A felfűtés lépéseit az alábbiakban vesszük számba.



6.4. ábra. A keresztfűtéses Massmann-kemence rajza

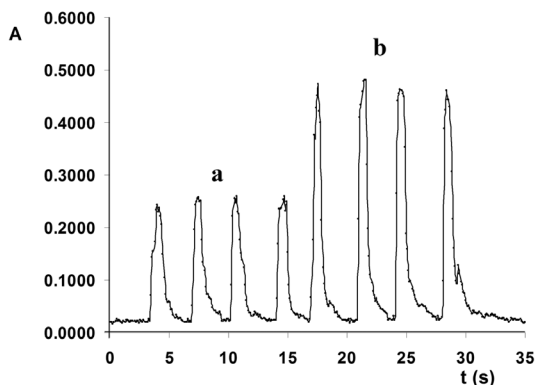
A *szárítás* célja az oldószer lassú, teljes elpárologtatása. A hevítés  $\sim 5$  K/s sebességgel történik, az atomizátort maximálisan 380 K -re melegítik 15-30 s időtartamra.

A *hamvasztás* során a mintát elbontják, az alkotót kísérő anyagokat eltávolítják, az alkotót kémiaiilag átalakítják úgy, hogy az atomizáláshoz optimális formában legyen. E lépésben az atomizátort  $\sim 50$  K/s sebességgel 700-1300 K hőmérsékletre hevítik 10-40 s időtartamra. A legfontosabb átalakulások ebben a lépésben a szerves vegyületek, karbonátok, egyes oxidok stb. elbomlása, illetve az illékony anyagok elpárologása. Az atomizátorban a grafit redukáló tulajdonsága miatt egyes fémvegyületek elemi fémmé redukálódnak (Pt, Au, Cu stb.), mások oxidokká, karbidokká, szulfidokká stb. alakulnak.

Az *atomizálás* során képződnek a szabad atomok és történik az elnyelés mérése. Az atomizátort maximális sebességgel (ez az 5000 K/s értéket is elérheti) 2400-2800 K hőmérsékletre izzítják, 5-10 s időtartamra. A grafitcsőben a térfogategységben keletkezett atomok számát ( $N_0$ ) a következő egyenlet adja meg:

$$N_0 = \frac{m_a \varepsilon \beta}{e_g V_c M_a Z_t}, \quad (6.11)$$

ahol  $m_a$  az alkotó tömege,  $\varepsilon$  a szabad atomok, ionok, molekulák előállításának hatásfoka a szilárd mintából,  $\beta$  az alapállapotban levő atomok száma,  $e_g$  a semleges gáz hőkiterjedési együtthatója,  $V_c$  az atomizáló cella térfogata,  $M_a$  az alkotó atomtömege,  $Z_i$  az elektron megoszlási függvénye. A lángnélküli atomizálásnál az  $\varepsilon\beta$  szorzat  $\sim 1$ , míg a lángok esetében ez az érték csupán  $10^{-3}$ - $10^{-4}$  nagyságrendű. A gázfázisban az atomok a grafitcső légteréből a környező hideg térbe, illetve a grafitcső anyagába diffundálnak, emiatt az elnyelés időben változik, egy maximumon áthaladó, hegyes csúccsal jelentkező görbét kapunk (6.5. ábra).



6.5. ábra. A cink atomgőz fényelnyelésének változása az idő függvényében:  
a – 4 ng Zn ; b – 8 ng Zn

A maximum értéke, valamint az elnyelési görbe alatti terület az alkotó mennyiségével arányos. A mennyiségi meghatározásoknál ezen értékek egyikét határozzák meg.

A *tisztítás* vagy *kiégetés* során az atomizátort 10-15 s időtartamra az atomizálási hőmérsékletnél 100-200 K-nel magasabb hőmérsékletre hevítik, hogy a grafitba diffundált atomok belőle eltávozhassanak. Ha a grafitban atomok maradnak vissza, ezek a következő felfűtéskor kidiffundálnak, megnövelve az alkotó elnyelését. Ezt a jelenséget *memóriaeffektusnak* nevezzük. A memóriaeffektus csökkentése céljából a cső felületét pirolitikus grafitral vonják be, mely egy nemporózus, tömör réteget képez, meggátolva az atomok diffúzióját a cső falába.

## 6.5. Zavaró hatások (interferenciák)

Zavaró hatáson a mért analitikai jel mindazon szisztematikus változásait értjük, amelyeket az alkotó mellett jelenlevő anyagok (mátrix) okoznak.



A szisztematikus változás amiatt lép fel, hogy a standard oldatok összetétele nem azonos a mintaoldatával. A hatások két csoportra oszthatók: spektrális és nemspektrális zavaró hatásokra.

A *spektrális zavaró hatás* akkor lép fel, ha az elemző vonal hullámhosszán egy molekula elnyelése is jelentkezik (nemspecifikus- vagy háttérelnyelés). Ugyancsak látszatelnyelést, és spektrális zavarást, okoz az aeroszol részecskék felületén fellépő fényszóródás. A spektrális zavaró hatás kiküszöbölésére (háttérkorrekció) négy módszert alkalmaznak: a kétvonalas módszert, a deutériumlámpás, a Zeeman-, illetve a Smith–Hieftje-háttérkorrekciót. Első esetben két mérést végeznek: az egyik mérést az alkotó elemző vonalán, a másikat pedig annak közvetlen közelében, attól 0,1-0,5 nm távolságra. Az első méréssel az összelnyelést határozzák meg, míg a másodikkal csak a nemspecifikus elnyelést. A két jel különbsége pedig az atomi elnyelés értékét adja. A *deutérium lámpás háttérkorrekció* esetén a lángot felváltva világítják át a deutérium-, illetve az üreghatódos sugárforrással. A deutérium sugárforrással az összelnyelést mérik a monokromátor sáv szélességének megfelelő kb. 0,1 nm-es hullámhossztartományban, míg az üreghatódos sugárforrással csak az elemző vonalon. A két jel különbsége az atomi elnyelés értékét adja. A *Zeeman-háttérkorrekció* esetében az üreghatódos sugárforrást helyezik erős, homogén mágneses térbe. A mágneses tér hatására az emissziós spektrumvonal 3 komponensre hasad fel. Az egyik komponens, a  $\pi$ , hullámhossza azonos az eredeti spektrumvonal hullámhosszával. A másik két komponens, a  $\sigma^+$  és  $\sigma^-$ , hullámhossza 0,013 nm-rel nagyobb, illetve kisebb, mint a  $\pi$  komponensé. A  $\pi$  és  $\sigma$  komponensek polarizációs síkja egymásra merőleges. A monokromátor elé helyezett polarizációs szűrő elforgatásával felváltva mérik az elemzővonalon ( $\pi$ ), illetve a dublettek ( $\sigma$ ) hullámhosszán az elnyelést. A két elnyelés különbsége az atomi elnyelés pontos értékét adja. Az eljárás előnye, hogy csak egy sugárforrást és egy optikai utat használ fel, a sávos elnyelést az elemző vonalhoz közel mérik, ezért a korrekció pontos. Hátránya, hogy az erős mágneses térben csökken a sugárforrás stabilitása. Másik lehetőség az, hogy a grafitkemencét helyezik mágneses térbe, ez esetben az abszorpciós vonalak felhasadása történik meg. A *Smith–Hieftje-háttérkorrekciós módszer* az önabszorpció, más néven vonalvisszafordulás jelenségét használja fel. A jelenség akkor lép fel, amikor egy nagyhőmérsékletű tér belső tartományaiban egy elemnek a gerjesztett atomjai által kisugárzott EMS-t a külső, hideg térben levő alapállapotú atomjai részben vagy teljes egészében elnyelik. Ezt a gyakorlatban úgy valósítják meg, hogy az üreghatódlámpa fűtőáramát extrém módon rövid ideig megnövelik (kb. 200 mA), a katódüregből a gerjesztett atomok által kibocsátott fényt az üreg



előtti térben jelenlevő alapállapotú atomok elnyelik. Két mérést végeznek, az egyiket a normális üzemeltetéshez szükséges kis áramerősség (5-15 mA), illetve a másikat a nagy áramerősség mellett. Az első esetben az elemző vonal hullámhosszán az összelnyelést mérik, míg a második esetben, az emissziós vonal kiszélesedése miatt, a nem specifikus elnyelést. A két elnyelés különbsége ez esetben is az atomi elnyelés értékét adja.

A *nemspektrális zavaró hatások* a szabad atomok keletkezését befolyásolják. A transzportzavarások (vagy fizikai interferencia) a mintaoldat a standardoktól eltérő fizikai tulajdonságai miatt jelentkezik (viszkozitás, felületi feszültség, illékonyság), minek következtében változik az időegység alatt a lángba juttatott folyadékmennyiség, a folyadékcspepek párolgási sebessége stb. A párolgási zavarások (vagy kondenzált fázisú kölcsönhatások, kémiai interferencia) a szilárd aeroszol részecskék párolgási sebességének megváltozásából erednek a kísérő anyag jelenlétében. Például a földfémek foszfát- vagy szulfát-ionnal termikusan stabil vegyületeket hoznak létre; Mg, Al, Si stb. jelenlétében pedig magas olvadáspontú spinellszerkezetű oxidok keletkeznek. A jelenség ún. felszabadító ágens (releaser) adagolásával kiküszöbölhető (jelen esetben lantán-klorid adalékkal, főlöslégyben), amely a zavaró ágenssel képez termikusan stabil vegyületet. Ugyancsak jelcsökkenés tapasztalható, ha a nyomokban jelenlevő alkotó a nagy mennyiségben jelenlevő mátrixba beágyazódik. A gázfázisú zavaró hatások jelentkezésekor az elem gőzfázisbeli disszociált vagy ionizált hányadában történik változás. Legjelentősebb az ionizációból következő zavaró hatás (ionizációs interferencia), mely főleg a magas hőmérsékletű lángokban jelentkezik, pl. az alkáli- és földfémek esetében. A jelenség egy anyag, az ún. ionizációs puffér vagy szuppresszor adagolásával szorítható vissza, mely az alkotónál könnyebben ionizálódik a lángban (pl. K-, Sr-, Rb- vagy Cs-só) megnövelve jelentősen az elektronok koncentrációját a lángban.

## 6.6. AAS-meghatározások, kiértékelési módszerek

Az AAS-módszer relatív analitikai módszer, ezért a műszert ismert koncentrációjú anyagokkal kalibrálnunk kell. A két leggyakrabban alkalmazott kiértékelő eljárás az összehasonlító és a standard addíciós módszer.

Az *összehasonlító (hitelesítő-, kalibrálógörbe-) módszer* során ismert koncentrációjú kalibráló (standard) oldatsorozatot készítenek, melyek elnyelését mérik. Ábrázolva az *A* változását a koncentráció függvényében,

az analitikai mérőgörbét (kalibráló egyenest vagy görbét) nyerik. A minta elnyelését meghatározva, a standardokéval azonos kísérleti körülmények között, a kalibráló egyenes alapján interpolálással a minta elemtartalma pontosan meghatározható. A módszert nagyszámú minta sorozatelemzése esetén alkalmazzák, pontossága az egy komponenst tartalmazó mintánál az elkészített kalibráló oldatok koncentrációjának a pontosságától függ.

A *standardadagolás (addíció) módszerét* bonyolult összetételű minták esetén, zavaró hatások jelenlétében alkalmazzák. A mintához a meghatározandó alkotó adott koncentrációjú standardoldatát adják, és mérik az elnyelést az adagolás előtt, illetve utána. A koncentrációváltozás ismeretében a minta eredeti elemtartalma ( $C_x$ ) kiszámítható. Többször megismételve a standard adagolását a meghatározás pontossága jelentősen növekszik, mivel a számított koncentráció több meghatározás átlagértékét jelenti. Többszörös standardadagolás esetében a koncentráció meghatározása grafikus úton is lehetséges. Ábrázolva az  $A$  értékeket  $C$  függvényében egy egyenest kapunk. Az egyenes tengelymetszetének a távolsága az abszcisszán ( $A = 0$  pontban) a  $C_x$  értékét adja. A standardadagolás módszere pontosabb, mint az előző, mert a kalibráló sorozat kísérőanyag-tartalma a mintáéval azonosnak tekinthető, amennyiben a mintaoldat hígulása a standardok adagolása következtében 5% alatt marad (kis térfogatú, töményebb standardok használata). Az eljárás hátránya az időigényesség (minden minta esetében 4-5 pontból álló kalibrációs görbét kell felvenni), ugyanakkor feltételezi az  $A$ - $C$  lineáris összefüggés előzetes ismeretét.

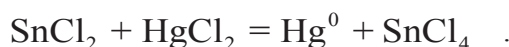
### 6.6.1. Hidridgenerálás (HG-AAS)

A periódusos rendszer 13., 14., 15. és 16. csoportjának több eleme (gallium, indium, tallium, germánium, ón, ólom, arzén, antimon, bizmut, szelén és tellúr) erősen redukáló környezetben naszcensz hidrogénnel gázhalmazállapotú hidridet képez, mely magasabb hőmérsékleten elemeire bomlik (HG-AAS = hydride generation-AAS), és a keletkezett atomgőzök a monokromatikus EMS-t elnyelik, aminek mértéke az atomok számával arányos. Így például a minta 20%-os sósavas oldatához 1%-os nátrium-tetrahidridoborát ( $\text{NaBH}_4$ ) lúgos oldatát adják, majd a keletkezett gázhalmazállapotú alkotókat a reakcióedényen átbuborékoltatott argonárammal két végén nyitott 10 cm hosszú kvarccsőbe juttatják. A kvarccső a láng-atomabszorpciós spektrométer acetilén-levegő lángja fölött található, így a fűtött kvarccsőben végbemegy a hidrid hőbomlása.

Az ürekatódlámpa fénye a kvarccsőön halad át, a hőbontás során keletkező alapállapotú szabad atomok koncentrációjukkal arányos fényelnyelést eredményeznek. A módszer nagy előnye abban áll, hogy az illékony alkotó könnyen, szelektíven választható el a mátrixtól, az atomizálás is nagy hatásokkal, viszonylag alacsony hőmérsékleten megy végbe.

### 6.6.2. Hidegőz (CV = cold vapor)-eljárás

Az eljárást a higany meghatározására vezették be, a higany illékonyságán alapszik. A higany az egyedüli fém, mely szobahőmérsékleten folyékony halmazállapotú, gőznyomása jelentős (0,0016 mbar), ami gőzfázisban 14 mg/m<sup>3</sup> atomos higanykoncentrációnak felel meg. Ezért a higany kis mennyiségben közvetlenül atomizálás (hevítés) nélkül elemezhető (innen az eljárás neve is). Első lépésben a higanyt vegyületéből 5%-os ón(II)-klorid-oldat segítségével savas közegben (30%-os kénsavoldat) elemi higannyá redukálják:



A keletkezett atomos higanyt gázfázisba viszik oly módon, hogy az oldaton Ar-gázt buborékoltnak állandó sebességgel (~ 1 L/perc). A gázáramot ezután a felszabadult higanygőzzel Mg(ClO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>-ot tartalmazó szárítócsövön vezetik át, majd pedig egy 10 cm hosszúságú kvarcablakos küvettába vezetik. A küvettán a higany ürekatódlámpa fényét átvezetve a higanyatomok számával arányos fényelnyelést mérnek a  $\lambda = 253,7$  nm hullámhosszon. Az eljárás kimutatási határát úgy lehet egy-két nagyságrenddel megnövelni, hogy a felszabadított higanygőz útjába egy nagy fajlagos felületű, aranygyapottal töltött, kis elnyelő oszlopot helyeznek. A higanygőz az arannyal stabil amalgám formájában megkötődik. A dúsítás befejezése után az oszlopot nagy sebességgel 700-800 K-re felfűtik, az amalgám elbomlik és a higanygőz egyszerre jut az ürekatódlámpa fényútjába. Ezen módszerrel a higany kimutatási határa akár femtogramig (10<sup>-15</sup>g-ig) is csökkenthető.<sup>7</sup>

## 6.7. Nagy felbontású folytonos fényforrással működő AAS (HR-CS AAS)

Az AAS-eljárás egyik legfőbb hátránya, hogy egyidőben csupán egy elem meghatározását teszi lehetővé, ugyanakkor minden meghatározható

elemre (hozzávetőlegesen 70) külön spektrállampát kell használni. A szimultán elemzés feltétele, hogy az egyes elemző vonalak a színekben egyidejűleg detektálhatóak legyenek. Ez három fontos egység megvalósítása mellett lehetséges: folytonos nagy energiájú sugárforrás, nagy felbontású monokromátor, megfelelő fotodetektor.<sup>8,9</sup> A *sugárforrás* folytonos, közel egyenletes nagy fényintenzitást kell, hogy biztosítson a 190-900 nm színek tartományában. Ezt az újonnan kifejlesztett nagynyomású (hidegen 17 bar) xenon mikro-ív lámpa biztosítja. Az ív kiterjedése kisebb, mint 1 mm, átmérője csupán 0,2 mm. A plazma hőmérséklete 10000 K. Az új lámpa teljesítménye 300 W (20V/15A). Ezzel a hagyományos xenon lámpához képest a fényintenzitás 100-szorosára nőtt az UV alsó tartományaiban is. A *hullámhossz kiválasztása* nagy felbontású rácson monokromátorral történik pikométer nagyságrendű sávzélességgel. Ehhez az ún. echelle prizma-rács kombinációjú fényfelbontást alkalmazzák magas, 50-150 rendben. A xenon lámpa fénye a belépő résen keresztül a kollimátor tükörré kerül, ahonnan egy 30°-os kvarcprizmán keresztül a prizma síkjára merőleges, az echelle rácsra esik. A rácson felbomló és visszaverődő színek újából áthalad a prizmán, ahol a különböző színekprendekek térben elkülönülnek egymástól. A kialakult kétdimenziós színek egy homorú tükör segítségével a detektor síkjára képződik le élesen. A *detektálás* CCD (Charge Coupled Device) detektor segítségével történik. Detektáló felülete 1024 x 1024 pixelből áll, egy pixel mérete 24 x 24 µm. Spektrális érzékenysége 180-860 nm közé esik, kvantumhasznosítási tényezője az UV-tartományban 0,9 elektron/foton. A detektor telítési kapacitása 600000-800000 elektron, a zajszint pedig 5-30 elektron pixelenként. A pixelben képződő elektronok pedig gyorsan, párhuzamosan jutnak el a kiolvasó regiszterhez, az egyes pixelek kiolvasása külön-külön történik.

## 6.8. Gyógyszer-analitikai alkalmazások

A meghatározások két nagy csoportra, közvetlen és közvetett meghatározásokra oszthatók.

A *közvetlen meghatározások* a gyógyszerkészítményben található fémek mennyiségi meghatározását jelentik. A meghatározást általában a minta savas/oxidatív feltárása előzi meg a szerves alkotók teljes elroncsolásával; így határozzák meg például a propoliszkivonat fém tartalmát (beleértve a nehézfémeket is),<sup>10</sup> a bárium-szulfát króm tartalmát,<sup>11</sup> a fogpaszta nehézfém tartalmát,<sup>12</sup> gyógyszerkészítmények Bi- és fém tartalmát,<sup>13,14</sup> gyógyfüvek nehézfém tartalmát<sup>15-18</sup> stb.

A közvetett meghatározások során egy alkotó mennyiségi meghatározása történik a mintában található fém meghatározása révén, amennyiben a fém mennyisége az adott alkotó mennyiségével arányos. Példának okáért említhető az ethambutol meghatározása az ethambutol-Cu komplex réztartalmának meghatározása révén, a kinin meghatározása a kinin-Zn komplex Zn-tartalma révén,<sup>19,20</sup> a paracetamol meghatározása a Fe(III) oxidálószer-felesleg meghatározásával,<sup>21</sup> inzulin meghatározása Zn-tartalma alapján,<sup>22</sup> a nimodipine meghatározása a redukció során felszabaduló Cd<sup>2+</sup>-ionok révén.<sup>23</sup> Leggyakoribb ilyen típusú alkalmazás az ionpárpépzésen alapszik: a meghatározandó alkotó egy fémkomplexszel vízben nehezen oldódó vegyületet, ionpárt képez. A csapadék szűrése és újraoldása után a fém meghatározása történik ismert AAS-eljárással; például fluorokinolonok,<sup>24,25</sup> cephalixin és cephradine,<sup>26</sup> captopril,<sup>27</sup> moxifloxacin hidroklorid<sup>28</sup> stb. meghatározása. Az AAS-eljárást széles körben felhasználják a gyógyszerkészítmények minőségbiztosításában is.<sup>29</sup>

## 6.9. Irodalom

A téma összefoglaló irodalma: (a) Lewen, N., *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2011**, *55*, 653. (b) Dionisio, A. G. G.; Dantas de Jesus, A. M.; Amais, R. S. et al., *Int. J. Spectrosc.*, **2011**, Article ID 262715, 30 p (c) Jaiswal, A. K.; Mohrana, M.; Krishna, P.H.R. et al., *J. Forensic Med. Toxicol.*, **2010**, *27*, 64. (d) Silvestre, C. I. C.; Santos, J. L. M.; Lima, J. L. F. C.; Zagatto, E. A. G., *Anal. Chim. Acta*, **2009**, *652*, 54. (e) Chaturvedi, R. K.; Das, S.; Animesh, K.; Pathak, M., *Medico-Legal Update*, **2009**, *9*, 1. (f) Görög, S., *J. Pharma. Biomed. Anal.*, **2005**, *36*, 931. (g) Stankovich, L.; Despotovski, S.; Liang, D., *ASSAY Drug Dev. Technol.*, **2004**, *2*, 1. (h) Evgeniev, M. I.; Garmonov, S. Yu.; Shakirova, L. Sh., *J. of Anal. Chem.*, **2001**, *56*, 313. (i) Yebra, M. C., *trends Anal. Chem.*, **2000**, *19*, 629. (j) Schwedt, G., *CLB Chemie in Labor und Biotechnik*, **1999**, *50*, 244. (k) Barefoot, R. R.; Van Loon, J. C., *Anal. Chim. Acta*, **1996**, *334*, 5. (l) Ohannesian, L.; Streeter A. J. (Eds.), *Handbook of Pharmaceutical Analysis*, Marcel Dekker, Inc., New York&Basel, **2002**.

1. Kirchhoff, G., *Monatsber. Preuss. Akad. Wiss. (Berlin)*, **1859**, 662.
2. Kirchhoff, G.; Bunsen, R. *Ann. d. Phys.*, **1860**, *109*, 275.
3. Walsh, A., *Spectrochim. Acta*, **1955**, *7*, 108.
4. Alkemade, C. Th. J.; Milatz, J. M. W., *Appl. Sci. Res., Sect. B.*, **1955**, *4*, 289.
5. L'vov, B. V., *Inzhener.-Fiz. Zhur., Akad. Nauk Belorus. SSR (J. Eng. Phys.[USSR])*, **1959**, *2/2*, 44.
6. Massmann, H., *Spectrochim. Acta Part B*, **1968**, *23*, 215.
7. Welz, B.; Schubert-Jacobs, M., *Fresen. Z. Anal. Chem.*, **1988**, *331*, 324.
8. Welz, B.; Becker-Ross, H.; Florek, S.; Heitmann, U., *High-Resolution Continuum Source AAS*, Wiley-VCH; Weinheim, **2005**.
9. Posta J., *Atomabszorpciós spektrometria*, Hallgatói Információs Központ, Budapest, www.tankonyvtar.hu, **2006**.

10. Cvek, J.; Medid-Saric, M.; Vitali, D.; Vedrinaro-Dragojević, I.; Smit, Z.; Tomic, S., *J. Apic. Res.*, **2008**, *47*, 35.
11. Bolzan, R.C.; Rodrigues, L.F.; Mattos, J.C. et al., *Talanta*, **2007**, *74*, 19.
12. Popova, S.; Marinova, A., *J. of the Univ. of Chem. Technol. and Metall.*, **2007**, *42*, 413.
13. Cadore, S.; dos Anjos, A.P.; Baccan, N., *Analyst*, **1998**, *123*, 1717.
14. Taylor, A.; Branch, S.; Halls, D. et al., *J. Anal. At. Spectrom.*, **2002**, *17*, 414.
15. Hina, B.; Rizwani, G. H.; Naseem, S., *Pak. J. Pharm. Sci.*, **2011**, *24*, 353.
16. Moreno, D. A.; Carvajal, M. et al., *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **2006**, *41*, 1508.
17. Adepoju-Bello, A. A.; Issa, O.A. et al., *Afr. J. Biotechnol.*, **2012**, *11*, 6918.
18. Hina, B.; Rizwani, G. H.; Shareef, H.; Ahmed, M., *Pak. J. Pharm. Sci.*, **2012**, *25*, 247.
19. Hassan, S. S. M.; Shalaby, A., *Microchim. Acta*, **1992**, *109*, 193.
20. Ogunlana, O. O.; Ogunlana, O. E.; Ademowo, O.G., *Sci. Res. Essay*, **2009**, *4*, 180.
21. Issa, M. M.; Nejem, R. M.; El-Abadla, N. S. et al., *Indian J. Pharm. Sci.*, **2008**, *70*, 344.
22. Tănase, I.G.; Popescu, I. L.; Pană, A., *Analele Universității din București – Chimie*, **2006**, *XV (serie nouă)*, 45.
23. Canlica, M.; Isliyeli, S., *Turk J. Chem.*, **2005**, *29*, 141.
24. Salem, H.; Khater, W.; Fada, L., *Am. J. Pharmacol. Toxicol.*, **2007**, *2*, 65.
25. El-Brashy, A.M.; El-Sayed Metwally, M.; El-Sepai, F. A., *J. Chin. Chem. Soc.*, **2005**, *52*, 253.
26. Al-Ghannam, S. M., *J. Food Drug Anal.*, **2008**, *16*, 19.
27. Yarong, L.; Huiyun, L.; Feng, T.; Gengsheng, J., *Fenxi Huaxue, Chin. J. Anal. Chem.*, **2002**, *2*, 165.
28. Abdellaziz, L. M.; Hosny, M. M., *Anal. Chem. Insights*, **2011**, *6*, 67.
29. *Quality assurance of pharmaceuticals: a compendium of guidelines and related materials. Vol.2, Good manufacturing practices and inspection.* – 2nd ed., World Health Organization Publication, **2007**.

# 7. Ultraibolya-látható (UV-VIS) spektroszkópia

Meszlényi Gábor, Ritz Ferenc

## 7.1. Bevezetés

A spektroszkópia alapjainak lefektetését 1666-tól számíthatjuk. Ekkor sikerült Isaac Newtonnak régebbi elméletét igazolni, hogy ti. a fény komponensekből áll. Egy sötét szobában a beáramló napfény útjába helyezte a prizmat és a szemközti, fehér falon megjelentek a szivárvány jól ismert színei (7.1. táblázat). A prizma már régebben ismert eszköz volt, de korábban nem tudták, hogy refrakcióra (fénytörésre) képes és a fehér fényt felbontja komponenseire.<sup>1</sup> A jelenséget spektrumnak (*spectrum* latinul „megjelenés”, ti. a színeké) nevezte el. A színeknek megfelelő hullámhossztartományokat természetesen nem ismerhette, de leírta, hogy a színek a vöröstől az ibolyáig terjednek, és köztük egymásba folyó átmeneti színek vannak (narancssárga → zöldeskék), továbbá – Descartes mellett – szintén magyarázatot adott a szivárvány keletkezésére és alakjára.

7.1. táblázat. A látható (fehér) fény összetevői

hullámhossz /nm	szín megnevezése	komplementer szín
400–470	ibolya	sárga
470–550	kék	narancs
550–580	zöld	vörös
580–610	sárga	ibolya
610–660	narancs	kék
660–780	vörös	zöld

Hosszú idő telt el, mire kiderült, hogy van „sugárzás” a „vörösön innen” és az „ibolyán túl”. Majdnem 140 évvel Newton prizmás kísérlete után Friedrich William Herschell angol csillagász 1800-ban felfedezte az infravörös (IR) sugárzást. E tény és az ezt bizonyító kísérlet szinte minden infravörös spektroszkópiával foglalkozó könyv megemlíti, az ultraibolya (továbbiakban: UV) sugárzás felfedezéséről viszont nem tesznek említést a szakkönyvek. Alig egy évvel később, 1801-ben Johann Wilhelm Ritter német fizikus és vegyész leírta, hogy milyen sugárzás van az



„ibolyán túl”, de a kísérleteit részletesen nem dokumentálta.<sup>2</sup> Lehetséges, hogy a nap sugárzását sikerült felbontania, de az sem kizárt, hogy az UV-fényt katódsugárcsővel állította elő. Úgy bizonyította, hogy a láthatónál nagyobb energiájú sugárzásról van szó, hogy ezüst-klorid csapadékot megvilágítva a „megfeketedés” (ezüstkiválás) azonnal bekövetkezett, holott ez a kémiai reakció természetes fény hatására csak hosszabb idő alatt játszódik le. Az „UV-sugárzás” elnevezés nem a fiatalon, 33 évesen elhunyt Rittertől származik, hanem kollégáitól, akik később így kezdték használni. Az „ultra” előtag arra utal, hogy az „ibolya színűnél” nagyobb energiájú sugárzásról van szó.

Szintén sok évnek kellett eltelnie, mire az elektromágneses sugárzás teljes spektrumát felfedezték. 1895-ben Wilhelm Conrad Röntgen német fizikus nagyfeszültségű vákuumkisülési csövek vizsgálata során előállította a röntgensugarat. Az első felvételt 1895-ben felesége kezéről ő maga készítette. Munkásságáért 1901-ben, elsőként kapta meg a fizikai Nobel-díjat.

A spektroszkópai módszerek, s közöttük elsőként az UV-spektroszkópia alkalmazására kidolgozott vizsgálati módszerek széleskörű elterjedése a természettudományos kutatásokban az elmélet, a szerkezetkutatás, az ipari alkalmazások stb. terén a XX. századhoz köthetők. A mai értelemben vett UV-spektrofotometriás analízis kialakulása és elterjedése az első Beckman DU UV-VIS spektrofotométer 1940-es években történő kifejlesztésének köszönhető. A II. világháború után az UV-VIS módszert az összes korszerű műszeres analitikai laboratórium bevezette a vizsgálati eszköztárába. Az UV-VIS spektroszkópai méréseket semmilyen analitikai laboratórium nem nélkülözheti, a gyógyszeripar számára pedig különösen fontos, nélkülözhetetlen műszeres mérési módszer.

## **7.2. A molekuláspektroszkópia módszerei**

Molekuláspektroszkópiának nevezzük azokat a műszeres mérési módszereket, amelyek az elektromágneses sugárzás (fény) és molekuláris rendszerek kölcsönhatásán alapulnak. Megkülönböztethetők a fény abszorpciójára (UV-VIS, IR), illetve emissziójára (fluoreszcencia, foszforeszcencia) épülő vizsgálati módszerek. Az analitikai információt spektrum formájában kapjuk, amikor is a függőleges tengelyen az elnyelt vagy kibocsátott sugárzás intenzitásával, a vízszintes tengelyen a hullámhosszal, illetve a frekvenciával vagy az energiával kapcsolatos mennyiséget ábrázoljuk. A felvett spektrumból következtethetünk



– sok más információ között – a vizsgált molekula szerkezetére, tulajdonságaira vagy az adott közegben levő koncentrációjára. A fontosabb molekulaszpektroszkópiai módszereket a felhasznált elektromágneses sugárzás energiája szerint csoportosítva a 7.2. táblázat szemlélteti. A foton energiája és hullámhossza fordítottan arányos:

$$\Delta E = h \cdot \nu = h \frac{c}{\lambda}, \quad (7.1)$$

ahol  $\Delta E$  a besugárzó foton energiaváltozása,  $h$  a Planck-állandó,  $\nu$  a fény rezgésszáma,  $c$  a sebessége,  $\lambda$  pedig a hullámhossza.

7.2. táblázat. A legfontosabb molekulaszpektroszkópiai módszerek

hullámhossz	jele	spektroszkópiai módszer	spektroszkópiai jelenség
0,5–10 pm	-	Mössbauer, gamma	magátmenet
0,01–10 nm	XR	röntgen	törzselektronok gerjesztése
10–180 nm	FUV	távoli (vákuum) ultraibolya	vegyértékelektronok gerjesztése
180–400 nm	UV	ultraibolya	vegyértékelektronok gerjesztése
400–800 nm	VIS	látható	vegyértékelektronok gerjesztése
800–2500 nm	NIR	közeli infravörös	rezgések felhangjai
2,5–25 $\mu$ m	IR	analitikai infravörös	rezgési és forgási átmenetek
25–300 $\mu$ m	FIR	távoli infravörös	forgási átmenetek
0,3 mm – 10 cm	MW	mikrohullámú	forgási átmenetek
10 cm – 1 m	ESR	elektronspinrezonancia	elektronspinátmenet
1 m – 1 km	NMR	mágneses magrezonancia	magspinátmenet

### 7.2.1. Az UV-VIS tartomány felosztása

A gyakorlati UV-spektroszkópia hullámhossztartománya 190-400 nm, a látható (VIS) tartomány 400-800 nm, az ún. távoli (FUV) vagy vákuum-UV tartomány 10-190 nm. Utóbbinak nincs nagy jelentősége a gyakorlati UV-spektroszkópiában, mert a levegőben, illetve a mintatérben levő

oxigén, illetve nitrogén elektronjai ebben a tartományban gerjesztődnek, és a mérést csak úgy lehet kivitelezni, ha a mintatér vákuum alatt van. Éppen ezért a kereskedelemben kapható UV-VIS spektrofotométerek mérési tartománya általában 190-900 nm; kb. 400 nm-ig UV-spektroszkópiái, e felett pedig látható mérésekre alkalmasak. Ez utóbbi tartományban kizárólag színes anyagok mérhetők (7.1. táblázat).

Az UV-VIS tartomány meteorológiai, illetve egészségügyi (az emberi szervezetre gyakorolt hatás szerinti) felosztása: UV-A (315-380 nm), UV-B (280-315 nm) és UV-C (100-280 nm).<sup>1</sup>

## 7.2.2. Elektronátmenetek az UV-VIS tartományban

A molekuláspektroszkópia alapja, hogy a molekulák az elektromágneses sugárzást (a besugárzó fényt) abszorbeálják, miközben az elnyelt energiával megemelt új energiaszintre kerülnek. A molekulák energiaállapotát az elektronok energiaállapota, valamint az atomok rezgési és forgási állapota együtt szabja meg:

$$\Delta E = E_e + E_v + E_r, \quad (7.2)$$

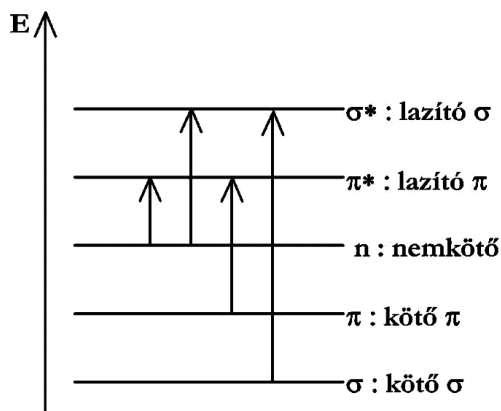
ahol  $\Delta E$  a gerjesztés során elnyelt energia,  $E_e$  az elektrongerjesztési energia,  $E_v$  a rezgési (vibrációs) energia és  $E_r$  a forgási (rotációs) energia.

Az UV-VIS tartományban elnyelt fényenergia hatására elektrongerjesztés játszódik le: a molekula külső pályán elhelyezkedő elektronjai nagyobb energiájú pályára gerjesztődnek. Első közelítésben a két pálya energianívói közötti energiakülönbséget fedezi az elnyelt fény energiája, ezért az UV-VIS spektroszkópiát elektronspektroszkópiának is nevezik. Miközben az elektronok energiaállapota változik, a molekula rezgési és forgási szintjei is gerjesztődnek [ld. (7.2) összefüggés], mivel az UV-VIS sugárzás nagyobb energiájú, mint ami a rezgések és forgások gerjesztéséhez szükséges (ld. 7.2. táblázat).

A fentiek csak elméleti jelentőségűek, mivel a rutinmérésekkel nyert külső elektrongerjesztés okozta UV-spektrum folytonos burkoló görbe, amely elfedi a gerjesztett rezgési és forgási átmenetek okozta finomszerkezetet. Oldatban a molekulák közötti intermolekuláris erők a finomszerkezetet alkotó részmaximumokat kiszélesítik, „elmosás”,

<sup>1</sup> Az UV-B analitikai szempontból nagyon jól használható tartomány, azonban az emberi bőr megbetegedését okozhatja (melanoma alakulhat ki). Az UV-C tartomány egy része (200-280 nm) analitikai mérésekre alkalmas, tartós expozíció esetén viszont az emberi szervezetre halálos lehet. Napozás, szolárium szempontjából csak az UV-A sugárzásnak nincs egészségkárosító hatása.

a spektrum strukturáltsága nem látszik, ezért az UV-VIS tartományban felvehető oldatspektrumok széles sávokból állnak. Nagyfelbontású vonalas, sávós, strukturált spektrumot általában csak gáz-gőz fázisban lehet megfigyelni (oldatfázisban az elektrongerjesztések és rezgésátmenetek egyes kombinációi bizonyos esetekben megjelenhetnek). A gőzfázisú mérések speciális körülményeket igényelnek, és az így nyert spektrumokat főleg elméleti kutatásokban használják fel.



7.1. ábra. A gerjesztés során lejátszódó elektronátmenetek

Az UV-VIS fény hatására lejátszódó lehetséges elektronátmeneteket leegyszerűsített formában a 7.1. ábra mutatja be. Bár az ábrán látható összes folyamat lejátszódhat, gyakorlati szempontból azon kettős kötésű rendszerek  $\pi$ -elektronjainak van meghatározó szerepe, melyek más elektronrendszerekkel vannak kapcsolatban konjugáció vagy delokalizáció révén. Ezeket a csoportokat nevezzük *kromoforoknak*, ezekben a kötőelektronok (a közeli UV-VIS tartományba eső sugárzással) könnyen gerjeszthetők és intenzív sávjuk van. A kromofor csoportokban  $\pi \rightarrow \pi^*$  gerjesztés történik ( $\pi^*$  a gerjesztett állapot jelölése). Az UV-sugárzás elnyeléséhez tehát nem elegendő, ha a vizsgálandó molekula egyetlen izolált kettős kötést tartalmaz (pl. az olajsavnak nincs UV-elnyelése).

Ha a kromofor heteroatomot tartalmazó csoporttal lép konjugatív kölcsönhatásba, akkor az új kromofor csoport még könnyebben gerjeszthető és még intenzívebb elnyelési sávot ad. A heteroatomot (általában nitrogént, oxigént, kenet vagy halogént) tartalmazó csoportot *auxokróm* csoportnak nevezzük. A legjellemzőbb auxokrómok pl. a nitro-, hidroxil- és szulfoncsoportok. A kromofor elnevezés onnan származik (*chroma* görögül szín), hogyha kellően nagyszámú konjugáció alakul ki,

akkor a spektrum eltolódik a látható tartományba (pl. a trinitro-fenol sárga színű). Bár az elnevezés nem mindig jogos, mert a kölcsönhatás miatt nem minden esetben tolódik el a spektrum a látható tartományba, mégis, megállapodás szerint, a kromofor és auxokróm elnevezés használatos. Az auxokróm csoportokban gyakran  $n \rightarrow \pi^*$  gerjesztés következik be. A  $\sigma \rightarrow \sigma^*$  átmenetek (egyszeres kötés) gerjesztésekor – az elektronnak lazítópályára kerülésekor – a kötés jelentősen meggyengül, vagy tulajdonképpen megszűnik, a molekula szétesik, mert nincs energianyereség a kötést létrehozó két atom egy-egy atompályájának energiájával szemben. Mindez sávkiszéledéssel, intenzitáscsökkenéssel jár. Egyszeres kötést tartalmazó szerves molekulák tehát UV-VIS spektroszkópiával nem vizsgálhatók.

A kromoforok és auxokrómok kölcsönhatása az abszorpciós maximum eltolódását okozza és a gerjesztés intenzitása is változik. Az abszorpciós maximumok eltolódásai a következők lehetnek:

- *Batokróm eltolódás:* a sávrendszer eltolódása a nagyobb hullámhosszak felé
- *Hipszokróm eltolódás:* a sávrendszer eltolódása a kisebb hullámhosszak felé
- *Hiperkróm hatás:* az intenzitás növekedése (általában a batokróm eltolódással függ össze)
- *Hipokróm hatás:* az intenzitás csökkenését jelenti (nem egyértelmű, hogy melyik eltolódással függ össze)

1942-ben Robert Burns Woodward kimutatta, hogy csak a konjugált rendszerhez közvetlenül kapcsolódó csoportok befolyásolják az abszorpciós sáv helyzetét és intenzitását. A helyettesítő csoportok hatása az abszorpció hullámhosszára nagyjából additív, egy-egy  $\pi$ -konjugáció mintegy 30 nm-rel tolja el az abszorpciót a nagyobb hullámhosszak felé.<sup>3,4</sup>

Az UV-VIS spektroszkópiában is összefüggés van a molekulaszervezet, az abszorpciós maximum, a spektrum jellege és lefutása (sávalak) között. Ha figyelembe vesszük azt a tényt, hogy sok, különböző szerkezetű molekula UV-spektruma nagyon hasonló, megállapítható, hogy a módszer nem alkalmas molekulák szerkezetének meghatározására. A minta és a referenciaanyag spektrumának összehasonlításával annyi valószínűsíthető, hogy a minta azonos lehet a referenciaanyaggal, de biztos azonosítás nem lehetséges.<sup>2</sup> Például egy, a kromofor csoporttól távoli csoport cseréjének nincs számottevő hatása a spektrumra.<sup>5</sup> Az UV-módszert ezért csaknem kizárólag a később ismertetésre kerülő koncentrációmeghatározásra használják fel. A szerkezetkutatásban – ritka kivételektől eltekintve – csak szerencsés esetekben, legtöbbször egyéb módszerekkel együtt (IR, NMR,

<sup>2</sup> Az azonosítás (indentitás igazolásának) legbiztosabb eszköze az IR-spektroszkópia.

MS) lehet ismeretlen szerkezetek felderítésére és a kémiai folyamatokat követésére felhasználni.<sup>6,7</sup>

### 7.3. A módszer alkalmazása a mennyiségi analitikában. Lambert–Beer-törvény

Az UV-VIS spektroszkópia abszorpciós spektroszkópai módszer. A Lambert–Beer-törvény értelmében a mérendő koncentráció egyenesen arányos a mért abszorbanciával.

Pierre Bouguer francia matematikus és fizikus 1729-ben felállított tétele szerint egy átsugárzott réteg vastagsága és az elnyelődő sugárzás mennyisége között arányosság áll fenn. Johann Heinrich Lambert német matematikus és fizikus 1760-ban Bouguer fénytani kísérletére alapozva az átlátszó közeg fénygyengítésének mértékét differenciálegyenletbe foglalta:

$$-dI = k \cdot I \cdot dl. \quad (7.3)$$

A (7.3) összefüggés kimondja, hogy az elemi intenzitáscsökkenés ( $-dI$ ) arányos a  $dl$  rétegre beeső fényintenzitással ( $I$ ) és az elemi rétegvastagsággal ( $dl$ ). A  $k$  arányossági tényező jelentését csaknem egy évszázaddal később August Beer (1825-1863) német fizikus adta meg, bizonyítva, hogy a (7.3) összefüggés állandója nem más, mint a „moláris abszorpciós koefficiens”-nek és a fényelnyelő anyag koncentrációjának a szorzata:

$$-dI = \varepsilon \cdot c \cdot I \cdot dl. \quad (7.4)$$

A (7.4) differenciálegyenletet integrálva és feltételezve, hogy a rendszer homogén, megkapjuk a Lambert–Beer-törvényt:

$$A = \lg \frac{I_0}{I} = \varepsilon \cdot c \cdot l, \quad (7.5)$$

ahol  $A$  a mért abszorbancia,  $I_0$  a mintát érő, gyengítetlen fényintenzitás,  $I$  a mintát elhagyó, gyengített fényintenzitás,  $\varepsilon$  a moláris abszorpciós együttható,  $c$  a minta koncentrációja (pl. mol/dm<sup>3</sup>-ben),  $l$  pedig az optikai fényúthossz (a kuvetta vastagsága pl. cm-ben). A (7.5) összefüggés alapján tehát a koncentráció és a fényúthossz egyenesen arányos az abszorbanciával.

A transzmittancia ( $T$ ), vagyis az átérésztés, az alábbi viszonyban áll a fényintenzitással:

$$T(\%) = \frac{I}{I_0} \cdot 100. \quad (7.6)$$

Az abszorbancia és az áteresztés egymáshoz logaritmikusan kapcsolódik:

$$A = \lg \frac{I_0}{I} = \varepsilon \cdot c \cdot l = \lg \frac{100}{T(\%)}. \quad (7.7)$$

A (7.7) összefüggés alapján az áteresztés mérésénél figyelembe kell venni, hogy a koncentráció és az optikai fényúthossz a transzmittanciával nincs lineáris összefüggésben. Ha az áteresztést a fényúthosszal (pl. küvetavastagsággal, a mért fóliavastagsággal), vagy a koncentrációval korrigálni kell, akkor az áteresztést először át kell számítani abszorbanciára. Elvégezzük a lineáris korrekciót, és a (7.8) összefüggés alapján a korrigált abszorbanciából a következő módon számítjuk ki az áteresztést:

$$T(\%)_{\text{korrigált}} = 10^{-A_{\text{korrigált}}} \cdot 100. \quad (7.8)$$

A (7.4) és (7.5) összefüggésben szereplő moláris abszorpciós koefficiens ( $\varepsilon$ ) könnyen meghatározható. Gyakorlati szempontból hasznos még bevezetni a fajlagos abszorbancia (vagy más néven fajlagos abszorpciós együttható) fogalmát, amely lényegében az 1 g/100 ml tömegkoncentrációra átszámított, mért abszorbancia. Az angol nyelvű szakirodalomban a gyógyszerkönyvekben a *specific absorbance*, a spektroszkópiai könyvekben pedig az *absorptivity* elnevezés szerepel. A fajlagos abszorbanciát  $A_{1\text{cm}}^{1\%}(\lambda)$ -val szokás jelölni, melyben a jobb alsó index arra utal, hogy 1 cm-es küvetában végeztük a méréseket, illetve hogy 1 cm-re számítottuk át a mért abszorbanciát. A jobb felső index (1%) azt jelöli, hogy az abszorbanciát 1 g/100 ml-re vonatkoztatjuk, a zárójelben pedig a mérési hullámhosszt tüntetjük fel nm-ben. Mivel a fajlagos abszorbancia 100 ml-re vonatkozik, a moláris abszorbancia viszont 1000 ml-re, ezért a fajlagos abszorbanciát a molekulatömeg tizedrészével megszorozva kapjuk meg a moláris abszorbanciát.

A leírtakat a következő konkrét gyakorlati példa szemlélteti, ahol a feladat az adott vegyület fajlagos és moláris abszorbanciájának meghatározása:

1. Bemérés: 20,52 mg/50 ml. (Általános esetben, amikor a mérendő vegyület intenzíven gerjeszhető kromofor csoportot tartalmaz, a kezdő bemérés célszerűen 20-50 mg/50 ml.) A mintaoldat 2,0 ml-ét 50,0 ml-re hígítottuk kétjelű pipettával. A 290 nm-es abszorpciós maximumnál mért abszorbancia 0,782 volt. Ennek rövidített jelzése:  $A(290)_{\text{mért}} = 0,782$ . A vegyület moláris tömege ( $M$ ) legyen 512,3 g/mol.
2. Koncentráció átszámítása g/100 ml-re: 0,04104 g/100 ml.

3. Hígítás figyelembevétel: 0,04104 g/100 ml osztva 50 ml/2 ml = 25-tel, tehát 0,00164 g/100 ml. Azért szükséges hígítani, mert a kistömegű bemérés a mérést rendkívül pontatlanná teszi. (A 0,1 mg pontosságú analitikai mérlegek minimumtömege általában 10-15 mg, ennél kisebb tömeget nem célszerű bemérni.)

4. Fajlagos abszorbancia kiszámítása:

$$A_{1\text{cm}}^{1\%}(290) = \frac{A(290)_{\text{mért}}}{c(\text{g}/100\text{ml}) \cdot l(\text{cm})} = \frac{0,782}{0,00164} = 477.$$

5. Moláris abszorbancia (más szóval moláris abszorpciós együttható) kiszámítása:

$$\varepsilon = A_{1\text{cm}}^{1\%}(290) \cdot 0,1 \cdot M(\text{g}/\text{mol}) = 477 \cdot 0,1 \cdot 512,3 = 24437.$$

6. A moláris abszorpciós együttható logaritmusa:  $\lg(\varepsilon) = 4,39$ .

Láthatjuk, hogy a fajlagos és a moláris abszorbancia kiszámítása egyszerű aránypárokkal lehetséges. Ezeknek az állandóknak nagy jelentőségük van. Az UV-mérések eredményeként nemcsak magát a spektrumot és az oldószert kell megadni, hanem a bemérést, a hígítást, a fajlagos abszorbanciát és a molekulatömeget is.

Az UV-spektroszkópiában használhatunk többpontos kalibrációs egyenest a koncentráció meghatározásához,<sup>6</sup> azonban az általános gyakorlat szerint az abszorpciós maximumnak megfelelő hullámhosszon ( $\lambda$ ) képzett fajlagos abszorbanciákat használjuk fel a mennyiségi mérések során. Ha a minta tömegszázalékos összetételének meghatározása a feladat, akkor a minta és a standard fajlagos abszorbanciájának százalékos aránya megadja a tartalmat. Természetesen, ha a standard tartalma nem „100%”, akkor ezt a standard bemérésénél figyelembe kell venni. Abban az esetben, ha a minta vegyes százalékos koncentrációjának meghatározása a feladat, akkor a mért abszorbanciát szorozzuk meg a hígítással, és osszuk el a standard fajlagos abszorbanciájával; a kapott vegyes százalék koncentrációt tetszés szerint átszámíthatjuk, pl. mg/dm<sup>3</sup> koncentrációra. A fent leírtakat tömören az alábbi összefüggések fejezik ki:

$$\frac{A_{1\text{cm}}^{1\%}(\lambda)_{\text{mért}} \cdot 100}{A_{1\text{cm}}^{1\%}(\lambda)_{\text{standard}}} = c(m/m\%); \quad \frac{A(\lambda)_{\text{mért}} \cdot \text{hígítás}}{A_{1\text{cm}}^{1\%}(\lambda)_{\text{standard}}} = c(\text{g}/100\text{ml}). \quad (7.9)$$

Minőségbiztosított méréseknél mind a mintából, mind a standardból 3-3 párhuzamos mérést alkalmazunk; így kell eljárunk akkreditált és GLP (Good Laboratory Practice) besorolású laboratóriumokban is.

Homológ vegyületek (pl. alkil-fenol-polietilén-glikol-éterek) esetében a homológ sor egyes tagjainak mért fajlagos abszorbanciája és a



molekulatömegük reciproka lineáris összefüggésben van egymással, ami abból következik, hogy a sor tagjainak moláris abszorpciós együtthatói ( $\epsilon$ ) jó közelítéssel azonosnak vehetők. Ha a homológ, „UV-aktív” sor legalább két tagjánál megmérjük a fajlagos abszorpanciát ( $A_{1\text{cm}}^{1\%}$ ) és ábrázoljuk azt a molekulatömeg reciprokának ( $M^{-1}$ ) függvényében, akkor – amennyiben az egyenes meghosszabbítása a nulla pontba tart – a sor bármelyik, ismeretlen tagjának fajlagos abszorpanciáját megmérve, annak molekulatömege meghatározható.

Mint a spektroszkópia más területein, a korszerű szakirodalomban az UV-spektrumatlások is megtalálhatók. Az egyik legnagyobb UV-spektrumadatbázis az Organic Electronic Spectral Data<sup>8</sup>, amelyben a vegyületek összegképlet szerint vannak rendszerezve, és az 1946-1989 közötti időszakban összesen 31 kötete jelent meg. A vegyületek mellett fel van tüntetve az oldószer, a  $\log(\epsilon)$  és az irodalmi hivatkozás, ahonnan a mérési adat származik. Ha egy vegyületre több adat is szerepel, ezeket összehasonlítva az irreálisak kiszűrhetők. (Egyes vegyületek ui. a készülékek és módszerek pontosabbá válása miatt többször is szerepelhetnek a kötetekben.) A spektrumatlások segítségével egyrészt ellenőrizhető méréseink helyállósága és pontossága, másrészt az alábbi számítási módszerrel közelítőleg kiszámítható egy olyan vegyület oldatbeli koncentrációja is, amely nem áll rendelkezésre tiszta formában.<sup>3</sup>

Az UV-VIS spektrumgyűjtemények<sup>9,10</sup> az interneten és CD-n is hozzáférhetőek. Az egyik spektrumatlász<sup>9</sup> kb. 8200 spektrumot tartalmaz; előnye, hogy a vegyületeket kromofor rész szerint 27 csoportba sorolja, így egy-egy vegyületcsalád jellemző elnyeléséről is tájékozódhatunk. A másik spektrumgyűjtemény<sup>10</sup> 48000 anyag UV-VIS spektrumát tartalmazza.

### 7.3.1. A Lambert–Beer-törvény korlátai. Mérési hibák

A Lambert–Beer-törvény érvényességét, s ezzel a mérések pontosságát befolyásolhatják bizonyos mérési körülmények, s az ezek következtében fellépő fizikai-kémiai és/vagy fizikai jelenségek:

- Túl híg vagy túl tömény az oldat, ilyenkor disszociáció, asszociáció, solvatáció, illetve komplexképzés lehetséges. Ezek a jelenségek megváltoztathatják a mérés eredményét. A régebbi irodalom szerint az optimális abszorpancia tartomány 0,2-0,8, a mai korszerű

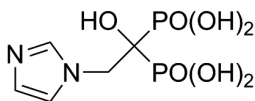
<sup>3</sup> Azt a  $\log(\epsilon)$ -t választjuk ki, ami legtöbbször szerepel. Ezután „antilogaritmust” képezünk, majd osztjuk a molekulatömeg tizedrészével, így megkapjuk a fajlagos abszorpanciát. Ezután már csak aránypárokkal kell dolgoznunk, hogy megkapjuk az anyagunk oldatbeli koncentrációját.



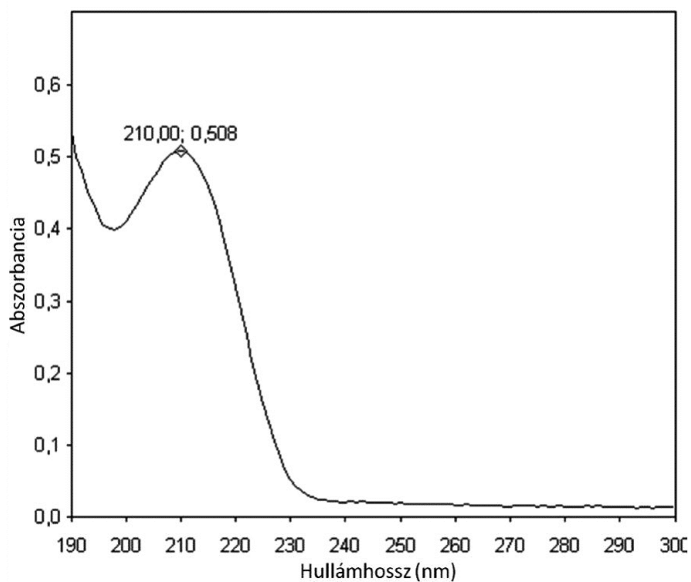
készülékekkel azonban ez a határ kibővült 0,1-1,2 abszorbanciáig. A gyakorlati tapasztalat az, hogy a  $< 0,1$  és a  $> 1,2$  méréseknél megnő a hiba. Az optimális tartományban viszont biztos, hogy az oldat kellően híg és szinte soha nem szükséges a törésmutatóval korrigálni.

- Kémiai reakciók, intermolekuláris kölcsönhatások, cisz-transz izomerizáció lehetősége. A bemért oldatokat a lehető leggyorsabban kell megmérni, hogy ne következhesse be a mérés közben olyan szerkezeti átalakulások, amelyek igen jelentős hibát okozhatnak; példának okáért a transz-forma spektruma általában mintegy 50-100%-kal intenzívebb cisz párjához képest.
- A modern, a gyártó cég szervizszolgálatával karbantartott, kalibrált, verifikált spektrofotométerek esetében mindig monokromatikus a sugárzás. Megfelelő szerviz hiányában a pontos mérések ezen feltétele nem garantált.
- A Lambert–Beer-törvény hőmérsékletfüggő, de a legtöbb spektrofotométer nem termosztált, ezért a nagymértékű hőmérséklet-változások észrevehetően befolyásolhatják a mérési eredményeket. Tehát elkerülendő, hogy a mérés alatt a laboratórium hőmérséklete jelentős hibát okozó mértékben változzék.
- Oldószer tisztaság. Az UV-spektroszkópiában leggyakrabban használt oldószer a víz (190 nm-től; a legjobban áteresztő oldószer), az acetonitril (210 nm-től), az etanol vagy metanol (220 nm-től), a ciklohexán (amely gondosan megtisztítandó a telítetlen szennyeződésektől; 200 nm-től) és az 1,4-dioxán (230 nm-től). A víz használatának határt szab, hogy a legtöbb szerves vegyület vízben nem oldódik, kivéve a szerves savakkal alkotott sókat (pl. hidrokloridok), vagy a poláris csoportot tartalmazó vegyületeket (pl. foszfonsavakat). Az acetonitril is főleg polárisabb jellegű vegyületek esetén használható. Poláris jellegű vegyületek esetében az etanol és metanol, míg apolárisak oldására a ciklohexán és az 1,4-dioxán alkalmazható.

A vizes oldatban végzett kis hullámhosszú mérés példájául a Zoledronsav (1) spektruma (7.2. ábra) szolgál. Az abszorpciós maximum 210 nm-nél van, s más oldószerben nem lehetséges ilyen alacsony hullámhosszon felvételt készíteni.

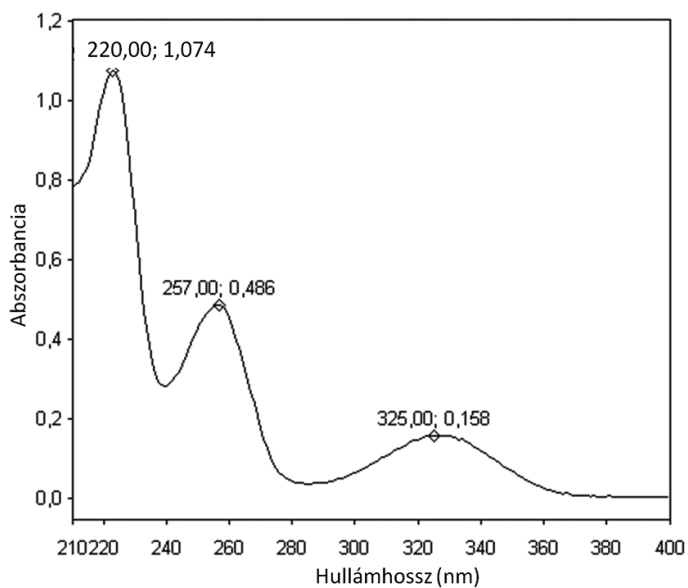


1

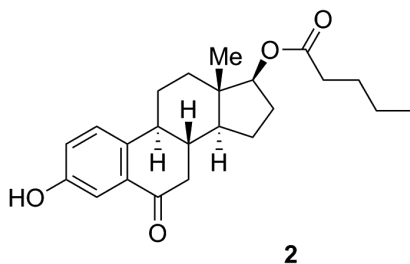


7.2. ábra. A Zoledronsav (1) UV-spektruma (20,22 mg/50,0 ml vizes oldatból 2,0 ml 25-szörösére hígítva vízzel)

A 6-keto-ösztradiol-valerát (2) összetettebb rendszer, a kromoforok egymásra hatása miatt ui. bonyolult az UV-spektruma.



7.3. ábra. A 6-keto-ösztradiol-valerát (2) UV-spektruma



Az etanolban készült spektrumnak több tanulsága is van:

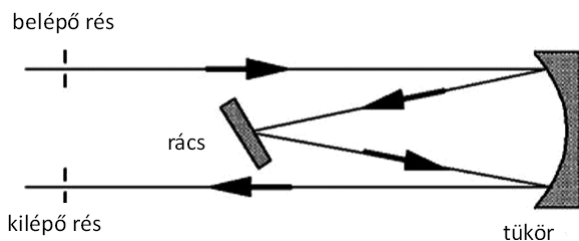
- a Woodward-szabályt nem lehet alkalmazni;
- a 220 nm-es maximum nem használható mennyiségi mérésre, mert nagyon közel van az etanol elnyelésének „kezdetéhez”;
- a 325 nm-es maximum túl érzéketlen a koncentráció változására.

A fentiek értelmében tehát az ideális analitikai mérési hely  $257 \pm 1$  nm.

## 7.4. Az UV-készülékek felépítése, a mérés elvégzése

Az UV-VIS spektrofotometriában kizárólag diszperziós készülékeket alkalmaznak. A Fourier-transzformációs méréstechnikát nem volt érdemes kifejleszteni, mert az UV-VIS tartomány szélessége (kb. 600 nm) durván 40-ed része az analitikai infravörös tartományénak (kb. 22500 nm), és nagyon ritkán kell a teljes tartományt regisztrálni. A felbontás pedig nem annyira alapvető követelmény, mint az IR-spektroszkópiában.

A régebbi UV-készülékekben a fény felbontására prizma szolgált, újabban kizárólag nagy intenzitású, diffrakciós optikai rácsokat alkalmaznak. A ma használatos UV-VIS spektrofotómeterekben a diszperziós elem kizárólag Ebert-féle monokromátor (7.4. ábra). A be- és a kilépő résnek is egyfajta spektrális szűkítő szerepe van. A kimeneti résre már csak olyan komponensek jutnak, melyek hullámhossza egy keskeny, monokromatikusnak tekinthető tartományba esik.

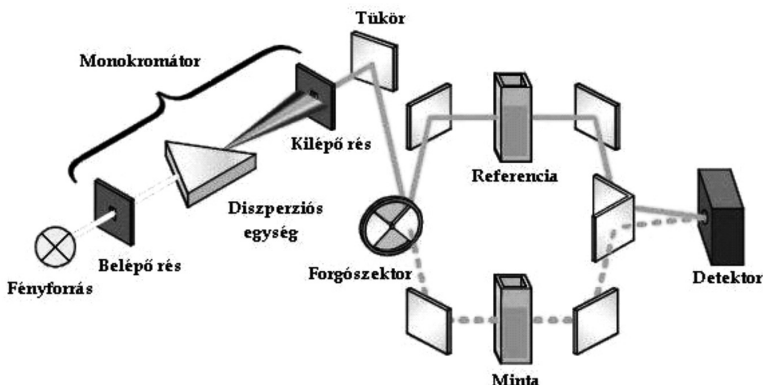


7.4. ábra. Az Ebert-féle monokromátor

A monokromátor belépő résén bejutó fény egy gömbtükörre esik, amely párhuzamos sugárnyalábot képez, és ezt vetíti a reflexiós rácsra. A rácsról a különböző hullámhosszúságú sugarak eltérő szögben, párhuzamos nyalábbbban reflektálódnak, melyeket a gömbtükör egy másik része leképez a kilépő rés síkjára. A rács elforgatásával tetszőleges hullámhosszú sugárkomponens vetítődik a kilépő részre. Az optikai diffrakciós rács lényegében  $N$  számú, egyforma szélességű rés, közvetlen egymás mellett elhelyezve. A felbontás a beeső sugárzás rácson bekövetkező reflexiójával jön létre. Egy adott irányba, adott beesési szög mellett bizonyos hullámhosszakra konstruktív (erősítő) interferencia lép fel.

A 190-900 nm-es tartományban a fényforrás deutérium- és volfrámlámpa. Az UV-tartományban a deutériumlámpa (190-400 nm), a VIS-tartományban pedig a volfrámlámpa működik. Bár a spektroszkópiai határ a két tartomány között 380-400 nm, a lámpaváltás a legtöbb készüléknél 315-340 nm között történik, mely előre beállítható 5 nm-es lépésközzel. A gyári beállítás 325 nm-nél van, mivel a kétféle lámpa energiagörbéje ezen a helyen keresztezi egymást. A korszerű készülékeknél a lámpaváltás beállítható (a rossz beállítást kijelzi a vezérlő program). A szakirodalomban megtalálható a deutériumlámpa beüzemelésének leírása. A lámpák érintése kerülendő, mert ez megváltoztathatja pozícionálásukat, ami a fotométer jó működését veszélyeztetheti.

A 7.5. ábra bal szélső részén látható az Ebert-féle monokromátor. A fényútmegszakítók (forgószektor) az optikai fényút kiegyenlítéséhez szükségesek. A detektor leggyakrabban fényelem, fotocella, fotoelektron-sokszorozó, fotodióda, fototranzisztor vagy fotodiódasor.



7.5. ábra. Az UV-VIS spektrofotométer belső felépítése

Az UV-VIS spektroszkópiában a mérendő oldatot és az oldószert 0,1-5 cm-es, esetleg 10 cm-es küvettában mérjük, de leggyakrabban 1 cm-es

küvetta használunk. A nehezen kitisztítható kis méretű küvetta használata helyett érdemes inkább meghígítani az oldatot. A 2-10 cm-es küvettaakra csak speciális esetben, nagyon kis koncentrációk meghatározásánál van szükség. A küvetta anyaga vagy kvarc, vagy üveg. Ha erősen párolgó oldószerben mérünk, akkor teflondugót kell alkalmazni.

Üvegeküvetta csak a VIS-tartományban (400-800 nm) használható, a kvarcküvetta viszont az egész tartományban (190-900 nm) megfelelő áteresztéssel rendelkezik.

A kvarcküvetta általában felül, két kék vonás között, QS jelzéssel látják el. Az 1 cm-es küvetta esetében a QS alatt vagy „1.000 cm”, vagy „10.00 mm” jelzést találunk, ami arra utal, hogy 1 cm-es, jó minőségű a küvetta (pontos optikai fényút). Ha nem egyértelmű a jelzés (üveg- vagy kvarcküvetta), akkor ez nagyon egyszerűen eldönthető: 280 nm-en a készüléket „lenullázzuk” és betesszük a kérdéses küvetta. Ha üvegeküvetta van dolgunk, akkor az abszorbancia az üveg minőségétől függően 1 és 2 között lesz. Ha viszont a levegővel szemben mért abszorbancia csupán néhány tized, akkor a kérdéses küvetta anyaga kvarc. Az üveg UV-elnyelő, a kvarc viszont az egész UV-VIS tartományban jól használható.

A küvetta két párhuzamos oldala (ahol a jel van) átlátszó, a másik két oldala pedig homályos. A küvetta mindig a homályos oldalán kell megfogni, és a méréseket ugyanolyan elhelyezésben kell végrehajtani; pl. a felirat mindkét küvetta esetében egy irányban legyen. Az átlátszó küvettaoldalakat kézzel nem szabad megérinteni, a mérés előtt azokat oldószerrel és papírvattával le kell tisztítani. A kézzel való hozzáérés fényszórást okoz, aminek a következménye a látszólagos abszorbancianövekedés.

A referencia- és mérősugárút küvettaikat nem szabad felcserélni a mérés alatt. Két mérés között a mérősugárútban levő küvetta a használt oldószerrel háromszor, majd a mérendő oldattal még kétszer át kell öblíteni, aminek eredményeképpen a mérésünk kellő pontosságú lesz.

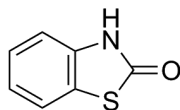
Az UV-VIS spektroszkópia fő alkalmazási területe a koncentrációmeghatározás, de jól használható hatóanyag-tartalom mérésére, továbbá – a kémiai szerkezettől függően – előnyös lehet szennyezés-vizsgálatokra is.

Tisztaság-ellenőrzésre szintén alkalmas a módszer: a standardéval összehasonlítjuk a csúcsokat és a csúcsalakot (a spektrum nem tartalmazhat egyéb és/vagy eltérő alakú csúcsot!), majd kiszámítjuk a fajlagos abszorbanciát.

Anyagok azonosságának vizsgálatára a módszer az IR-spektroszkópiánál kevésbé alkalmas, de az abszorpciós maximum hullámhosszának

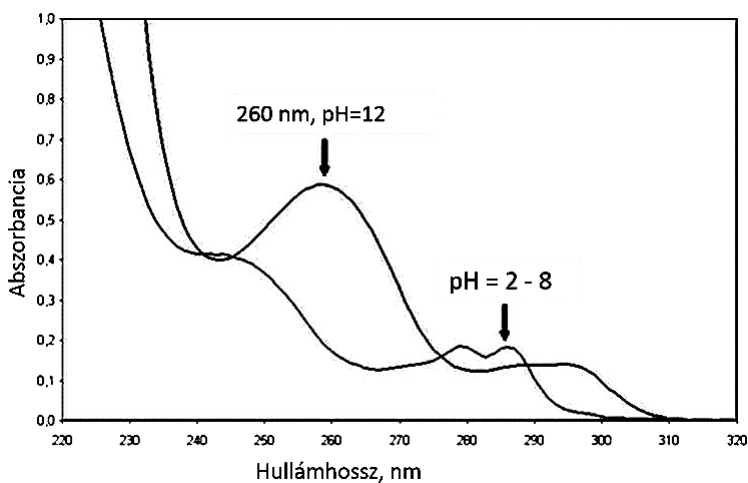
$\pm 1$  nm-en belüli és a fajlagosabszorbancia-érték  $\pm 2\%$ -os egyezése az adott oldószerben valószínűsíti a két minta azonosságát.

A fémek meghatározása színes komplexeik formájában mára már háttérbe szorult az atomabszorpciós (AAS) és az induktív csatolású plazma (ICP) spektroszkópia elterjedésével. A környezetvédelemben viszont helyszíni vizsgálatok során hordozható spektrofotométerekkel, speciális reagensekkel használják a komplexképzésen alapuló módszereket (hordozható AAS- és ICP-készülékek egyelőre még nincsenek).



3

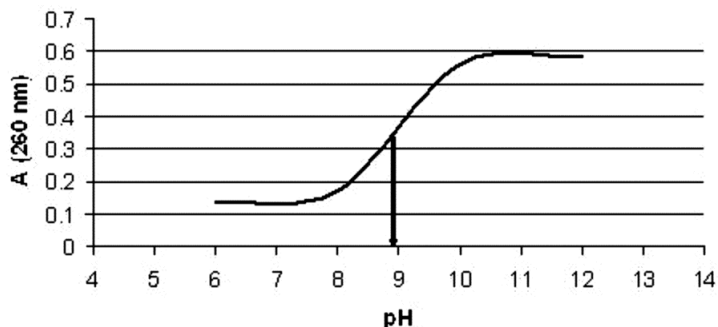
Az UV-VIS spektroszkópia egyúttal kiválóan alkalmazható egyensúlyi állandó, pl. disszociációs állandó ( $K_a$ , ill.  $pK_a$ ) meghatározására, ami az alábbi példán mutatható be. A benzotiazolin-2-on (3)  $pK_a$  értékét szeretnénk meghatározni UV-spektroszkópiai módszerrel. Kis mennyiségű metanol felhasználásával feloldjuk a vegyületet, majd Britton–Robinson-puffersorozattal hat, különböző pH-jú oldatot készítünk (pH = 2, 4, 6, 8, 10 és 12). A 7.6. ábra jól szemlélteti, hogy a pH növekedése jelentős batokróm eltolódást okoz.



7.6. ábra. A benzotiazolin-2-on (3) UV-spektruma különböző pH-értékeken

A nagyobb hullámhossznál levő maximumok a protonált formára jellemzők, míg a 260 nm-es csúcs a deprotonált formához rendelhető,

vagyis ekkor a nitrogénhez kötött hidrogén protonként disszociál, és a visszamaradó anion nátriumsóját tartalmazza az oldat. A mérésre legalkalmasabb hullámhossz 260 nm, itt a legnagyobb a molekula fajlagosabszorbancia-változása (a két görbe távolsága itt a legnagyobb).



7.7. ábra. A benzotiazolin-2-on (3) fajlagos abszorbanciájának (az egyszerűség kedvéért rövidített jelöléssel megadva) változása a pH függvényében

A 7.7. ábra a pH függvényében mutatja a fajlagos abszorbancia értékekének a változását. A pH = 6-8 közötti tartomány a protonált formát, míg a pH = 10-12 közötti pedig a deprotonált formát képviseli. Az emelkedő szakaszban a két forma egyensúlyban van egymással, míg a görbe inflexió pontjában a protonált és a deprotonált forma koncentrációja megegyezik. A pontot levetítve a pH-tengelyre megkapjuk a vegyület  $pK_a$  értékét ( $pK_a = 8,8$ ).

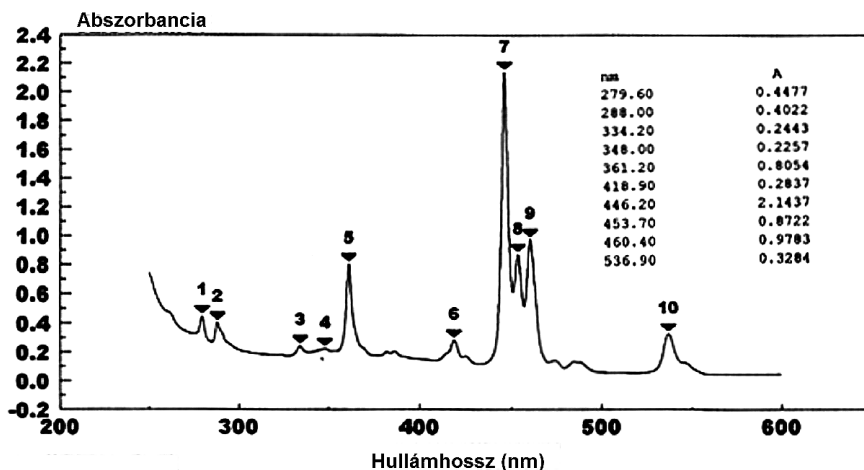
### 7.4.1. A készülékek kalibrálása

A spektrofotométerek működését adott időközönként ellenőrizni szükséges (hullámhossz és abszorbancia pontossága, szórt fény nagysága, felbontás, abszorbancia ingadozása, zaj stb.).

Ha ugyanazt a mintát azonos körülmények között többször megmérjük, akkor a maximumokhoz, illetve minimumokhoz tartozó abszcissaértékek (esetünkben a hullámhossz) az UV-tartományban (200-400 nm) megengedett maximális eltérése  $\pm 1$  nm, a látható tartományban  $\pm 3$  nm lehet.<sup>11</sup> A látható tartományban azért nagyobb a megengedett eltérés, mert a VIS-spektrumsávok szélesebbek, itt az abszorbanciát a maximumtól 3 nm-rel odébb mérve nincs számottevő változás az eredményben. Az UV-tartományban viszont a gyakran keskenyebb sávok (kisebb sáv szélesség) miatt a  $\pm 3$  nm-rel elcsúsztatott mérés már számottevő pontatlanságot okoz.

Az UV-VIS spektrofotométerekeket gyártó jelentősebb cégek kifejlesztették a ritkaföldfémekkel történő hullámhosszkála-kalibrálást. A ritkaföldfémek f-pályái közel vannak egymáshoz, s így az UV-VIS tartományban könnyen gerjeszthetők. Például a holmiumból készült kalibrálósűrők fémkeretbe foglalva, adott számmal és kalibrálási bizonyítvánnyal, a műszergyártó cégtől beszerezhetők. (Bár a tiszta fém maga „fémszínű”, de a felületén stabil barnás-vöröses oxidbevonat képződik.)

A holmium spektrumán (7.8. ábra) éles csúcsok jelennek meg. A kalibrálósűrőhöz tartozó bizonyítványban megadják az abszorpciós maximumokat; 240 nm-től lehet használni, és nem mindegyik maximum hullámhosszát adják meg. A bizonyítvány általában 3 évig érvényes, ezután a kalibrálósűrőt újra kell a szakszervizzel kalibráltatni. Az új mérési hullámhosszak néhány tizeddel eltérhetnek az előzőektől. A minőségbiztosítás fontos része, hogy csak érvényes bizonyítvánnyal rendelkező eszközök használhatók (akkreditált labor, GLP-, GMP-elvek).



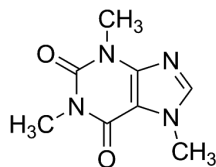
7.8. ábra. A holmium kalibrálósűrő spektruma

A VIS-tartományban ugyanilyen céllal didímium szűrőt használnak. Ez két ritkaföldfém, a praeodímium és a neodímium keveréke. Mindkét fém önmagában fémszínű, de együtt – a felületen képződött stabil oxidbevonat miatt – a didímium kalibrálósűrő sötétzöld színű.

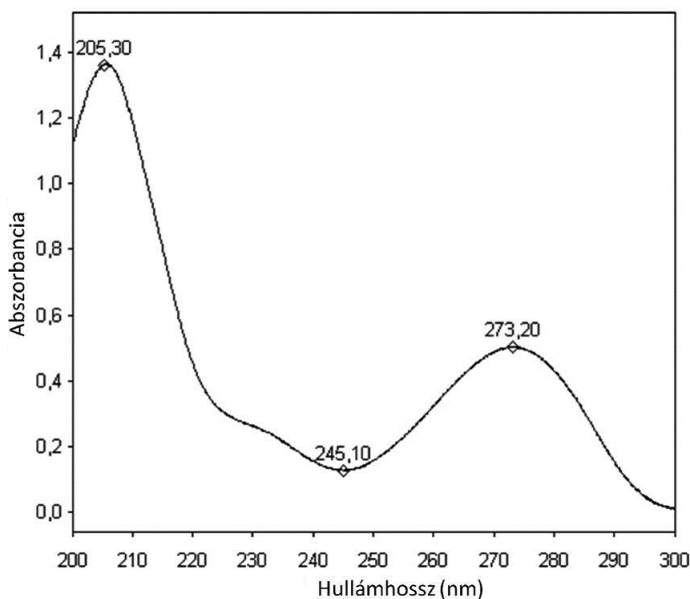
A kisebb hullámhosszak tartományának kalibrálására két lehetőség nyílik:

1. A spektrofotométerekeket gyártó cégek teflondugóval lezárt küvetta-ban forgalmazznak „ritkaföldfém kénsavas oldat”-ot, amely 190-től 300 nm-ig használható.





4



7.9. ábra. Kalibráció koffeinnel

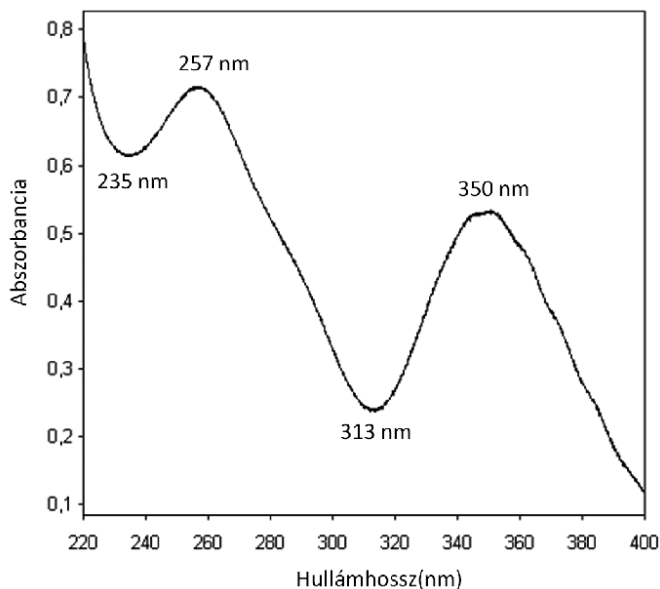
2. A koffein (4) vizes oldata szintén alkalmas alacsony hullámhosszú kalibrációra. Vízzel szemben felvesszük a koffein 10 µg/ml-es koncentrációjú vizes oldatának a spektrumát 200-300 nm között. A spektrumfelvétel sebességét lelassítjuk. A 205 és 273 nm-es abszorpciós maximumok és a 245 nm-es minimum helye ± 1 nm-en belül jól reprodukálható. A kalibrálási mód elfogadása folyamatban van a hatóságoknál.

### 7.4.2. Az abszorbanciamérés pontosságának és a szórt fény ellenőrzése

Az Európai Gyógyszerkönyv (Ph. Eur.) előír még további követelményeket is az UV-VIS spektrofotométerekkel szemben.<sup>11</sup>

Az abszorbanciapontosság látszólag nem fontos, hiszen általában standard anyaghoz viszonyítjuk a mintát, azonban „abszolút mérésekre” is szükség lehet, amikor meg kell adni a hatáságnak, vagy másik szakmai intézménynek, az adott minta fajlagos vagy moláris abszorbanciáját. A készülékeknek ezért megfelelő abszorbanciapontossággal kell működniük.

Az abszorbanciapontosság szűrőkkel történő ellenőrzésének módszere nem terjedt el, helyette kálium-dikromát oldattal végzendő ellenőrzést javasol az Európai Gyógyszerkönyv.<sup>11</sup> A dikromát-kromát rendszernek (savas oldatban a dikromát-, semleges vagy lúgos oldatban a kromátforma van jelen), az UV-tartományban elnyelése van, mert a dikromátanion krómatomjának d-pályái közel vannak egymáshoz, s így könnyen gerjeszthetők. A savas oldatban a dikromátanion nagyon stabil, elvileg hosszú időn át lehetne használni az abszorbanciaskála ellenőrzésére, de a minőségbiztosítási megfontolások csak megszabott időtartományra vonatkozó használatát teszik lehetővé. Az abszorbancia megengedett eltérése  $\pm 0,01$ . Az Európai Gyógyszerkönyvben az oldat elkészítésének módja is le van írva. A kálium-dikromát-por belélegzése rákkeltő hatású, így védőfelszerelés használata ajánlott. Az egészségkárosító hatás miatt a kereskedelmi forgalomban a kész oldatot forgalmazzák (pl. Merck cég).



7.10. ábra. Az abszorbanciapontosság ellenőrzése kálium-dikromát-oldattal

A Merck cég által forgalmazott 50 vagy 100 mg/L tömegkoncentrációjú kálium-dikromát 0,005 mol/L koncentrációjú kénsavval készült

oldatának UV-spektruma a 7.10. ábrán látható, a 7.3. táblázatban pedig az ellenőrzésre használt sávok hullámhossza, a bizonylaton szereplő, ezekhez tartozó és a készüléken mért abszorbanciák vannak feltüntetve. A Merck cég elismert mérésügyi hatóságok által kalibrált/hitelesített spektrofotométerekkel rendelkezik, az ezekhez tartozó kalibrálóoldatokkal mért eredmények megfelelnek az elvárt kritériumnak ( $\Delta A = \pm 0,01$ ). Minőségbiztosított laboratóriumban az oldatok fél-egy évig használhatók.

7.3. táblázat. Az abszorbanciapontosság ellenőrzésére használt sávok hullámhossza és a hozzájuk tartozó abszorbanciák

235 nm	0,621	0,614	$\pm 0,01$
257 nm	0,722	0,713	$\pm 0,01$
313 nm	0,242	0,238	$\pm 0,01$
350 nm	0,536	0,529	$\pm 0,01$

A szórt fény ellenőrzése szintén a spektrofotométer megbízható működésének kritériuma, ezt a szakszerviz végzi el. A készülékhibából származó nagy szórt fény (*stray light*) az abszorbanciát csökkenti, a rossz mérés (pl. foltos küvetta a mérő vagy összehasonlító sugárútban) miatt fellépő (*scattered light*) viszont növeli az abszorbanciát.

Ellentétben pl. az IR-spektroszkópiával, a felbontásnak – az elméleti jellegű mérések kivételével – az UV-VIS spektroszkópiában nincs nagy jelentősége; a szakszerviz ezt ritkaföldfémekből készült szűrővel szokta ellenőrizni. A gyógyszerkönyv a felbontás ellenőrzésére a toluol UV-spektrumának vizsgálatát javasolja. Ebben a 266 nm-es maximum jobboldali, leszálló ágában jelentkező 269 nm-es gyenge csúcs („bevágás”) azonosíthatósága a megfelelő felbontás kritériuma. Gyenge felbontás esetén csak egy inflexió látszik a spektrumgörbén.

Léteznek ún. CVU (Calibration Validation Unit), több paramétert egyszerre ellenőrző kalibrálóegységek is, melyek 3-5 év lejáratú bizonyítvánnyal kell, hogy rendelkezzenek. A CVU-egységeket általában a mérések alatt ki kell venni és csak a kalibrálás idejére lehet a készülékben tartani, de ezen a területen nagyarányú fejlesztések folynak; olyan CVU-egységet, melyet a mérés közben is bent lehet hagyni a műszerben, eddig csak egyetlen cég forgalmaz.

**CVU Test Results - k020816.str**

Instrument ID 053305      Calibration Dat@000.10.17  
Serial No.      S274      Certificate No.005

Test	Status	Date Of Test	
Wavelength Accuracy	Pass	2002.08.16	08:16:30
Absorbance Accuracy	Pass	2002.08.16	08:36:02
Stray Light	Pass	2002.08.16	08:38:08
Noise	Pass	2002.08.16	08:40:33
Drift	Pass	2002.08.16	08:50:09

7.11. ábra. Egy régebbi kalibrálóegység dokumentuma

Egy régebbi kalibrálóegység (7.11. ábra) a hullámhossz- és abszorban-  
ciapontosságot, a szórt fényt, a zajt és a driftet (abszorban-  
cia időbeli ingadozása) is ellenőrzi; egy ilyen ellenőrzés kb. két óráig tart és havonta  
célszerű elvégezni.

### 7.4.3. A mérések validálása

A validálás (hitelesítés) annak megerősítése, jóváhagyása, hogy a mérési  
eredmények reálisak, alátámasztják a szakmai ismeretekre, előzményekre,  
tapasztalatokra épülő feltételezéseket és várakozásokat, az eredmény  
nem hibás mérések, számítások, eljárások következménye, a gyanús  
eredményeknél megtörtént a független, mások által, más műszerrel végzett  
ismétlés, stb. A következőkben röviden összefoglaljuk, hogy miként kell  
eljárni az UV-VIS spektroszkópiái validálás során, amihez az irodalom<sup>12</sup>  
nyújt némi támpontot, de korántsem a teljesség igényével.

#### 7.4.3.1. Specifikusság

A mérési helyen (pl.  $287 \pm 1$  nm-en) az oldószer levegővel szembeni  
abszorban-  
ciájának kisebbnek kell lennie, mint 0,4. Ez a feltétel mindig  
teljesül, ha nem kis hullámhosszú mérési helyen mérünk. Ekkora  
abszorban-  
ciát a detektor képes még kompenzálni. Általában a mérési  
helyen az oldószer abszorban-  
ciája 0,1 alatt van.

#### 7.4.3.2. Linearitás

A validálás előtt már kidolgozott módszerrel kell rendelkez-  
nünk, és azt  
kell igazolni, hogy a kalibráció megfelelő.

A törzsoldat koncentrációja általában 20-50 mg/50 ml, ezt hígítjuk tovább 25-50-szeresre. „A” jelű mérőlombikra és ugyanilyen jelzésű, kétjelű, megfelelő és érvényes bizonyítvánnyal rendelkező pipettára lesz szükségünk.

A linearitás vizsgálatához mindig a standard mintát kell használnunk. A bemérés során a 80-120%-os intervallumban, két párhuzamossal, összesen 10 oldatot készítünk. (Pl. ha 50 mg a kezdő bemérés, akkor 40, 45, 50, 55 és 60 mg-ot mérünk be analitikai pontossággal az 50 ml-es mérőlombikba, és két párhuzamos mintasort készítünk.) A feltöltés, homogenizálás és hígítás után mérjük az abszorbanciákat.

A mért adatok feldolgozása tulajdonképpen a Lambert–Beer-törvény statisztikai igazolása. Ábrázoljuk a bemérés függvényében a mért abszorbanciákat, és a méréseinket különböző statisztikai paraméterekkel kiértékelve (regressziós együttható, az abszorbanciatengely konfidencia-tartománya, maradékok számítása) igazoljuk a linearitást.

#### **7.4.3.3. Pontosság (torzítatlanság)**

Mind a standardból, mind a mérendő mintából 5 bemérést végzünk a 80-120%-os tartományban az előzőekben leírtakhoz hasonlóan. Kiszámítjuk a visszanyerést úgy, hogy a mért abszorbanciák és a standard felhasználásával meghatározzuk a (7.9) összefüggés segítségével a bemérést, és azt százalékosan viszonyítjuk a valódi beméréshez. Ennek az értéknek egyenként és átlagosan 98,0-102,0% között kell lennie.

#### **7.4.3.4. Ismételhetőség**

A mintából 6 független bemérést – a standardból kettőt – alkalmazva kiszámítjuk a hatóanyag-tartalmakat tömegszázalékban. Természetesen a 98,0-102,0%-os feltételnek itt is teljesülnie kell, és a mérési eredmények RSD-értékének 0,7% alatt kell lennie.

#### **7.4.3.5. Reprodukálhatóság**

Egy másik laboratórium (rendszerint a módszert átvevő) az előző pontban leírtakat szintén elvégzi. A validálást végző laboratóriumnak (a módszert átadó laboratóriumnak) ebben a pontban nem kell újabb mérési sorozatot készítenie, az előző pont eredményeit felhasználhatja. Az elfogadási kritérium ekkor az, hogy a 6-6 mérés, valamint a 12 mérés

RSD-je 1,0% alatt kell, hogy legyen, illetve a két laboratórium mérési eredményeinek átlagai közti különbségnek kisebbnek kell lennie, mint 1,0%.

#### 7.4.3.6. Robusztusság

Mérjük időben (kezdő időpont, 0,5; 1; 2; 3; 4 óra) a standard és a mintaoldat abszorbanciáját. A standard oldatot minden időpontban frissen készítjük, és ennek az abszorbanciáját is mérjük. A mért abszorbanciaértékek nem mutathatnak tendenciát (időben se nem csökkenhetnek, se nem növekedhetnek), és az adott minta (standard vagy mérendő) mért abszorbanciáinak RSD-értékei kisebbek kell, hogy legyenek, mint 0,7%.

#### 7.4.3.7. Hatóanyag-tartalom számítása a validálásnál

A (7.9) egyenleteken alapuló számítások mindig alkalmazhatók az UV-spektroszkópiában. Hatóanyagtartalom-mérésnél, ha a standard és a mérendő minta esetében ugyanolyan nagyságrendű a bemérés, a hígítás, akkor a képletet le lehet egyszerűsíteni, mert a térfogatok és a hígítás kiesik.

### 7.5. Irodalom

1. Simonyi Károly: *A fizika kultúrtörténete*, Akadémiai Kiadó, Budapest, **1998**.
2. [http://hu.wikipedia.org/wiki/Johann\\_Ritter](http://hu.wikipedia.org/wiki/Johann_Ritter)
3. Scott, A. I.: *Interpretation of the Ultraviolet Spectra of Natural Product*, Pergamon, New York, **1964**.
4. Woodward, R. B. *J. Amer. Chem. Soc.* **1942**, 64, 72.
5. <http://hu.scribd.com/doc/96587725/Pokol-Gyorgy-Simon-Andras-Bezur-Laszlo-Horvai-Gyorgy-Horvath-Viola-Dudas-Katalin-Maria-Gyurcsanyi-E-Robert-Analitikai-Kemia> (eredeti mű: Pokol, Gy., Gyurcsányi, E.R., Simon, A., Bezúr, L., Horvai, Gy., Horváth, V., Dudás, K. M.: *Analitikai kémia*, Typotex kiadó, Budapest, **2011**).
6. Görög, S.: *Spektrofotometriás gyógyszeranalízis*, Akadémiai Kiadó, **1993**.
7. Görög, S.: *Ultraviolet-visible Spectrophotometry in Pharmaceutical Analysis*, PharmaMed Press, Hyderabad, **2011**.
8. Phillips, J.P., Bates, D., Feuer, H., Thyagarajan, B.S.: *Organic Electronic Spectral Data*, Wiley Press, New York, **1946–1989**.
9. Noelle, A.: *UV/VIS Spectra Data Base*, 9th Edition, **2013**.
10. Simons, W.W.: *The Sadtler Standard Spectra*, **2013**.
11. *European Pharmacopoeia* (Ph. Eur.), 7<sup>th</sup> Edition, **2013**.
12. *United States Pharmacopoeia* (USP), 35<sup>th</sup> Edition, **2013**.

# 8. Rezgési spektroszkópia

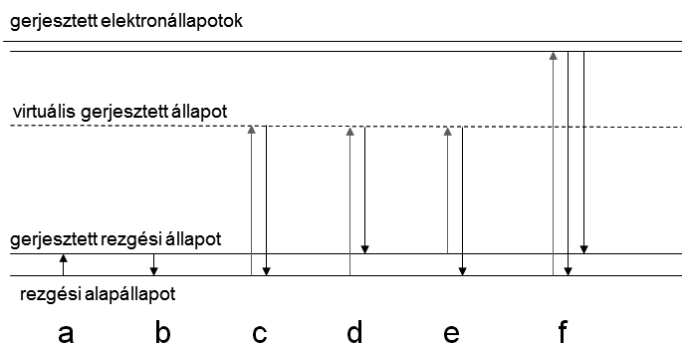
Tarczay György

## 8.1. Bevezetés és alapfogalmak

A molekulák rezgési energiaszintjei közötti átmenetekkel foglalkozó módszereket gyűjtőnéven rezgési spektroszkópiai módszereknek nevezzük. Ezek a módszerek a műszeres szerkezetkutatás olyan nemdestruktív technikái, amelyek ma már elengedhetetlen tartozékai mind a gyógyszerkutatással, mind a gyógyszer-analitikával foglalkozó modern laboratóriumoknak. Ebben a fejezetben a rezgési spektroszkópiai módszerek elméleti és technikai alapjait, valamint a főbb alkalmazási területeit mutatjuk be röviden. A témában alaposabban elmélyülni kívánó olvasó számos magyar, és még több naprakészebb angol nyelvű könyvet<sup>1-7</sup> talál ezekről a módszerekről.

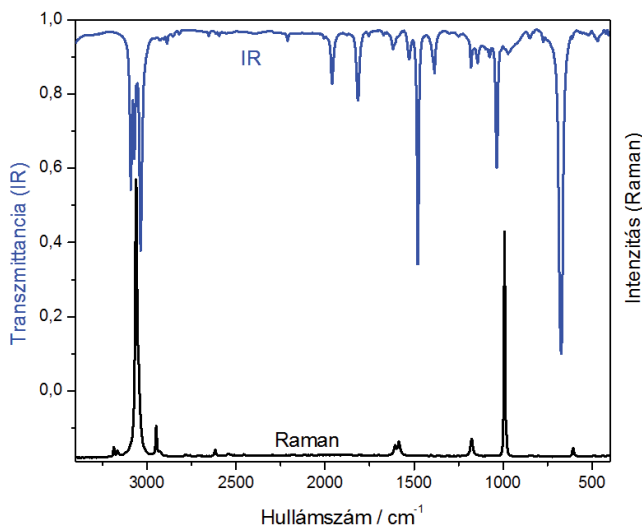
A rutinszerűen alkalmazott rezgési spektroszkópiai módszereket alapvetően két csoportba lehet osztani. Az egyik módszer esetében a rezgési energiaszintek közötti átmenet foton (azaz elektromágneses sugárzás) elnyelésével (abszorpcióval), vagy foton kibocsátásával (emisszióval) valósul meg (8.1. ábra). Mivel a rezgési szintek közötti átmenet jellemzően az infravörös sugárzás tartományába esik, ezért ezt a módszert *infravörös (IR = infrared) spektroszkópiának* nevezzük. Míg a szerkezetkutatásban, így a gyógyszerkutatás területén is, alapvetően az abszorpciós IR-módszert alkalmazzák, addig az emissziós IR-spektroszkópia speciális alkalmazásokban, így például kipufogó gázok és kerámiák analitikai vizsgálata, a légkörkémia és a csillagászat terén vált fontos módszerré. A molekulaszervezet-kutatás másik fontos rezgési spektroszkópiai módszere – a felfedezőjéről elnevezett – *Raman-spektroszkópia*. Ebben az esetben a vizsgált molekulákat (UV-, látható, vagy közeli IR-tartományba eső) monokromatikus fényel sugározzák be. A fény és a vizsgált molekulák kölcsönhatása során a fotonok nagyobb része energiaváltozás nélkül, azaz rugalmasan (*Rayleigh-szóródás*), míg kisebb része rugalmatlanul szóródik a molekulákon, azaz a foton a szóródás során energiát veszít (*Stokes-szóródás*) vagy nyer (*anti-Stokes-szóródás*). A szóródás során nyert vagy veszített energia a molekula rezgési (továbbá gázfázisban forgási) energiájának csökkenésére, illetve növekedésére fordítódik (8.1. ábra). Így a szórt fényben megjelenő, rugalmatlanul szóródott fény hullámhosszának ismeretében feltérképezhetjük a molekula rezgési

energiaszintjeit. Mivel az abszorpciós (vagy emissziós) IR- és a Raman-sávok intenzitása jelentősen eltérhet egymástól (8.2. ábra), ezért az IR- és Raman-spektroszkópia nemcsak technikailag egészíti ki jól egymást, de a két módszer együttes alkalmazása jelentősen segítheti a spektrumok asszignációját, a molekulaszervezet megfejtését.



8.1. ábra. Az abszorpciós (a) és emissziós (b) IR-spektroszkópia, Raman-spektroszkópia (c-e): Rayleigh-szóródás (c), Stokes-szóródás (d), anti-Stokes-szóródás (e), valamint a fluoreszcencia (f) mechanizmusa

Az infravörös sugárzás energiájától függően alapvetően eltérő típusú rezgési átmeneteket válthat ki, így a különböző tartományokban felvett spektrumokból nyerhető információ is eltérhet. Részben ebből következően az IR-spektrométerek felépítése, az alkalmazott technika, a mintatartó és



8.2. ábra. A benzol IR- és Raman-spektruma



az ablakanyagok, valamint az optika is függ a megfigyelt IR-tartománytól. Az infravörös spektroszkópia gyakorlatában ezért három tartományt szokás elkülöníteni.

Szerkezetkutatás szempontjából legfontosabb tartomány az *analitikai vagy középső (mid-IR, MIR)* régió. Ebben a kb.  $400\text{ cm}^{-1}$ -től  $4000\text{ cm}^{-1}$ -ig terjedő tartományban jelennek meg a kovalens kötésű vegyületek legfontosabb alaprezgései (azaz egy rezgési kvantummal történő gerjesztések, ld. 8.2. fejezet).

Az IR-sugárzás mintegy  $4000\text{ cm}^{-1}$ -től a látható fény tartományáig,  $\sim 12500\text{ cm}^{-1}$ -ig (800 nm-től 2500 nm-ig) terjedő részét nevezzük *közeli IR (near-IR, NIR)*-sugárzásnak. A NIR-tartományban az általában kis intenzitású, elsősorban O–H, C–H, N–H stb. nyújtási-rezgési felhangok (és kombinációs sávok, ld. következő fejezet) jelennek meg. A NIR-spektroszkópia szerkezetkutatás mellett kiválóan alkalmazható mennyiségi analízisre is. (A NIR-módszerekkel részletesen a 9. fejezetben foglalkozunk.)

A néhány  $10\text{ cm}^{-1}$  és kb.  $400\text{ cm}^{-1}$  közé tehető *távoli IR (far-IR, FIR)*-tartományban jelennek meg a gyenge (pl. intermolekuláris) kötések alaprezgései, a kis erőállandójú torziós rezgések (pl. neparomás gyűrűk deformációja), belső forgások, inverziók (pl. metilcsoport rotációja, aminocsoport inverziója), a nagy tömegű atomhoz vagy atomrészlethez köthető rezgések (pl. fémorganikus molekulák rezgései), gázfázisban kismolekulák (pl. víz) forgási átmenetei, a rácsrezgések, valamint egyes félvezetők elektrongerjesztési átmenetei is.

A távoli IR-rel részben átfedő kb. 1-től  $100\text{ cm}^{-1}$ -ig terjedő tartományt, ami frekvenciában kifejezve 60 GHz-től 3 THz-ig terjed, *terahertzes* tartománynak nevezik. Az elkülönítést az indokolja, hogy a XXI. század elejétől rendkívül gyors fejlődésnek indult a hagyományos (diszperziós és Fourier-transzformációs) IR-spektroszkópiái módszerektől működésében alapvetően eltérő, többek között a gyógyszerkutatás és gyógyszer-analitika területén is ígéretes jövő elé néző, terahertz-spektroszkópia.

## 8.2. A rezgési szintek és átmenetek elméleti leírása és számítása

A molekularezgések elméleti leírása során több közelítést lehet bevezetni. Az első általánosan alkalmazott közelítés a *Born–Oppenheimer-közelítés*, azaz a molekulán belül az elektronok és az atommagok mozgásának szétválasztása. Ennek a közelítésnek az az alapja, hogy a magokhoz

képezt 3–4 nagyságrenddel könnyebb elektronok jóval gyorsabban mozognak, így a magmozgások időskálájához képest pillanatszerűen kialakul az adott magkonfigurációhoz (azaz a magok adott térbeli helyzetéhez) tartozó optimális elektroneloszlás. A *Born–Oppenheimer-közelítés* eredményeképpen minden egyes magkonfigurációhoz megadható a rendszer energiája, amit *potenciális energiának* nevezünk.

A potenciális energia ismeretében a rezgési energiaszintek további közelítések nélkül, fizikai alapösszefüggésekből, variációs módszerrel kiszámíthatók, de ezt csak néhány atomból álló molekulák gázfázisú spektrumainak nagyon precíz számításakor alkalmazzák. Nagyobb molekulák esetében szintén általánosan alkalmazott közelítés a molekulaforgások és -rezgések szétválasztása. (Gázfázisú rezgési-forgási spektrumok esetében a rezgések és forgások jó közelítéssel külön kezelhetők, folyadék- és szilárdfázisban nincsenek forgási állapotok, ugyanakkor kondenzált fázisban a rezgési szinteket jelentősen befolyásolhatják az intermolekuláris kölcsönhatások. Az utóbbit lásd később.) Ugyan ma már kisebb és közepes méretű (maximum 10–20 atomból álló) molekulák számításánál is egyre gyakrabban túllépnek a következőkben ismertetett, ún. harmonikus oszcillátor közelítésen, de ezek a perturbációs anharmonikus számítások is a harmonikus modellre kapott eredményből indulnak ki.

Kétatomos molekulák esetében a *harmonikus oszcillátor modellben* a potenciális energia görbét ( $V$ ) egy parabolával közelítjük (8.3. ábra):

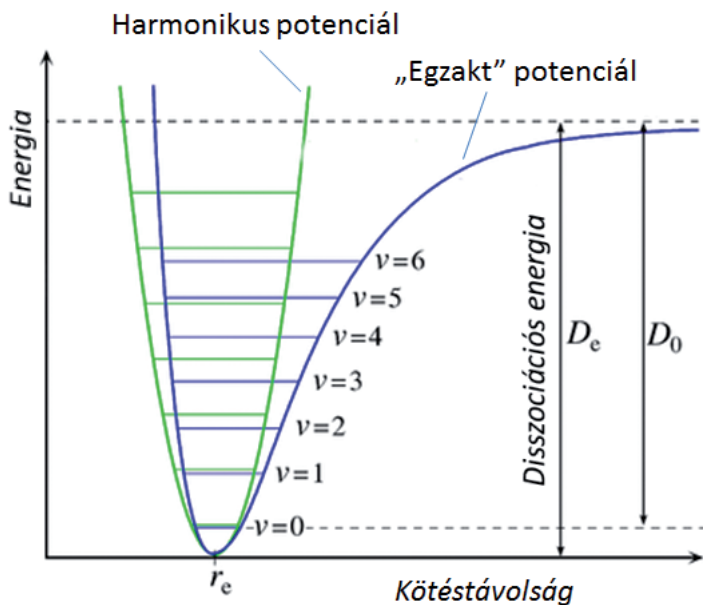
$$V(r) = \frac{1}{2}k(r - r_e)^2, \quad (8.1)$$

ahol  $r_e$  az egyensúlyi magtávolság,  $k$  pedig a kötés erősségét jellemző *erőállandó* vagy *kötésereősségi állandó*. A fenti egyenletből az erő kifejezhető:

$$-\frac{dV}{dr} = F = -k(r - r_e). \quad (8.2)$$

Ezt Newton második törvényébe helyettesítve egy differenciálegyenletet eredményez:

$$\mu \frac{d^2(r - r_e)}{dt^2} = -k(r - r_e), \quad (8.3)$$



8.3. ábra. A harmonikus közelítés

ahol  $\mu$  a redukált tömeg,

$$\mu = \frac{m_1 m_2}{m_1 + m_2}, \quad (8.4)$$

$m_1$  és  $m_2$  pedig a két atom tömege.

A differenciálegyenlet megoldásaként a következő egyenletet kapjuk:

$$r - r_e = X \sin(2\pi\nu t + \varphi_0), \quad (8.5)$$

ahol  $X$  a rezgés amplitúdója, azaz a maximális kitérése ( $r_{\max} - r_e$ ),  $\varphi_0$  a fázis (tetszőleges)  $t = 0$  időpontban, míg  $\nu$  a rezgés frekvenciája:

$$\nu = \frac{1}{2\pi} \sqrt{\frac{k}{\mu}}. \quad (8.6)$$

A rezgési spektroszkópiában a frekvencia helyett leggyakrabban a hullámszám ( $\tilde{\nu}$ ,  $\text{cm}^{-1}$  egységben) használatos:

$$\tilde{\nu} = \frac{1}{2\pi c} \sqrt{\frac{k}{\mu}}, \quad (8.7)$$

ahol  $c$  a fénysebesség.

Mivel a fenti egyszerű levezetés csak klasszikus fizikai alapokat használ fel, ezért kvantált rezgési energiaszintek és a szintek közötti

átmenetek meghatározására nem alkalmas. Ugyanakkor már a (8.6) és (8.7) egyenletből is világosan látszik, hogy minél erősebb a kötés, annál nagyobb frekvenciájú (és hullámszámú), míg minél nagyobb az atomok tömege, annál kisebb frekvenciájú a rezgés. Példaként a  $k \approx 4,5 \text{ N cm}^{-1}$  kötéseerősségi állandójú C–C rezgés  $\sim 1130 \text{ cm}^{-1}$ , míg a  $k \approx 9,4 \text{ N cm}^{-1}$  és a  $k \approx 15,7 \text{ N cm}^{-1}$  C=C és C≡C rezgések – a (8.7) egyenlettel összhangban –  $\sim 1630 \text{ cm}^{-1}$ , illetve  $\sim 2100 \text{ cm}^{-1}$  hullámszámúak. A C–H és a C–D kötések erőállandója ugyanakkora ( $k \approx 5 \text{ N cm}^{-1}$ ), de a két esetben a redukált tömeg jelentősen eltér. Az előbbi  $\sim 3000 \text{ cm}^{-1}$ , az utóbbi pedig – szintén a (8.7) egyenlettel összhangban –  $\sim 2200 \text{ cm}^{-1}$  hullámszámú. Könnyen belátható, hogy általánosan a hidrogén  $\rightarrow$  deutérium csere kb. 1,4-szeres frekvenciacsökkenést (és így hullámszámcsökkenést) eredményez:

$$\frac{\nu_{\text{XH}}}{\nu_{\text{XD}}} = \frac{\sqrt{k / \mu_{\text{XH}}}}{\sqrt{k / \mu_{\text{XD}}}} = \sqrt{\frac{\mu_{\text{XD}}}{\mu_{\text{XH}}}} = \sqrt{\frac{m_{\text{X}} m_{\text{D}} (m_{\text{X}} + m_{\text{H}})}{m_{\text{X}} m_{\text{H}} (m_{\text{X}} + m_{\text{D}})}} \approx \sqrt{\frac{m_{\text{X}}^2 m_{\text{D}}}{m_{\text{X}}^2 m_{\text{H}}}} \approx \sqrt{2}. \quad (8.8)$$

Az izotópszubsztitúció a nagyobb molekulák rezgési spektrumainak értelmezésénél nagy segítséget nyújt.

A rezgési energiaszintek és spektroszkópiai átmenetek számításához kvantummechanikai egyenletet, ebben az esetben a magmozgásokra vonatkozó (időfüggetlen) Schrödinger-egyenletet,

$$\hat{H}_{\text{N}} \Psi_{\text{v}} = E_{\text{v}} \Psi_{\text{v}}, \quad (8.9)$$

kell megoldani, ahol  $\Psi_{\text{v}}$  a különböző  $E_{\text{v}}$  rezgési szintekhez tartozó hullámfüggvények jele,  $\hat{H}_{\text{N}}$  pedig a magmozgásokra vonatkozó Hamilton-operátor, ami a potenciális energiát ( $V$ ) és a magok kinetikus energia operátorát ( $\hat{T}$ ) foglalja magába:

$$\hat{H}_{\text{N}} = \hat{T} + V. \quad (8.10)$$

Energiaszintekre megoldásként a

$$E_{\text{v}} = h\nu \left( v + \frac{1}{2} \right) = \frac{h}{2\pi} \sqrt{\frac{k}{\mu}} \left( v + \frac{1}{2} \right) \quad (8.11)$$

egyenletet kapjuk, ahol  $v$  a rezgési kvantumszám, amely a 0, 1, 2, 3, ... értékeket veheti fel. [A (8.11) egyenletből látható, hogy a  $v = 0$  esetben sem nulla a rezgési energia, ez az ún. nullaponti rezgési energia, azaz az a rezgési energiaszint, amit a vizsgált halmaz minden molekulája felvesz 0 K-re hűtve.]

A (8.9) sajátérték-egyenlet megoldása az energiaszintek mellett (sajátértékek) a rezgési szintekhez tartozó rezgési hullámfüggvényeket

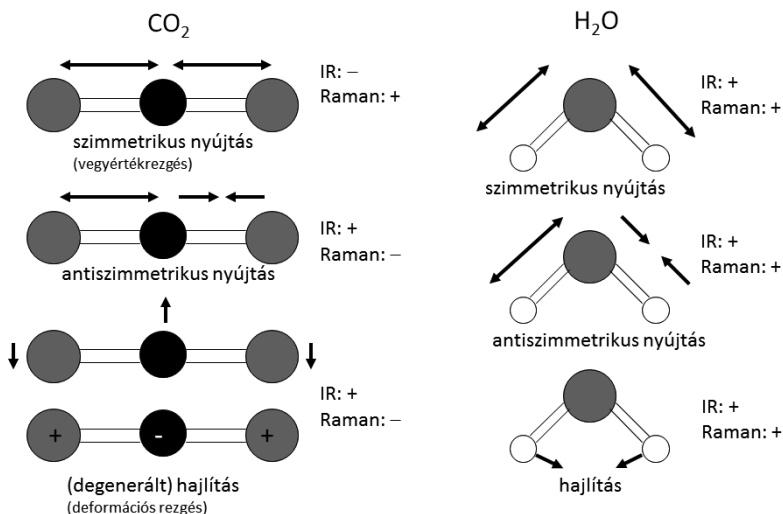
(sajátfüggvényeket, ebben az esetben az ún. Hermite-polinomokat) is megadja.

Többatomos molekulák esetében *csatolt* rezgésekre vonatkozó, *összefüggő egyenletrendszer*t kell megoldani. Az egyenletrendszer – harmonikus oszcillátor modellen belüli – megoldásként ún. *normálrezgési módusokat* kapunk. Ezek olyan rezgések, amelyekben az egyes atomok ugyanolyan frekvenciával és ugyanolyan fázissal mozognak.

Kvantummechanikai leírásban a rezgési hullámfüggvények vizsgálatával vezethetők le az ún. *kiválasztási szabályok*. Ezek értelmében – harmonikus potenciál esetében – mind az IR-, mind a Raman-átmenetek csak akkor valósulhatnak meg, ha  $\Delta v = \pm 1$ . Továbbá egy IR-átmenet csak akkor aktív, ha az adott normálrezgés közben változik a molekula dipólusmomentuma. (Másképp fogalmazva, az átmeneti dipólusa nem nulla.) Ez egy kétatomos molekula esetében megegyezik azzal a feltétellel, hogy legyen a molekulának dipólusmomentuma. A lineáris térszerkezetű  $\text{CO}_2$  esetében könnyen látható (8.4. ábra), hogy a molekula szimmetrikus nyújtási rezgése közben nem változik a dipólusmomentuma, ezért ez a rezgés nem IR-aktív. Ezzel szemben az antiszimmetrikus nyújtási és a hajlítási rezgések közben is változik a dipólusmomentuma, ezért ezek a rezgések IR-aktívak. A hajlított szerkezetű vízmolekula esetében minden rezgés IR-aktív.

Az IR-átmenetekkel szemben egy rezgés akkor Raman-aktív, ha a rezgés közben változik a molekula polarizálhatósága. Kvalitatívan a polarizálhatóság a molekula elektronfelhőjének kiterjedésével nő, ezért a kötések megnyúlása növeli a polarizálhatóságot. Kétatomos molekulák rezgése ezért mindig Raman-aktív. A vízmolekula minden rezgése, míg a  $\text{CO}_2$ -molekulának kizárólag a szimmetrikus nyújtási rezgése Raman-aktív.

A fenti, egyszerű  $\text{CO}_2$ -molekulán szemléltetett, példából is látható, hogy az IR- és a Raman-spektrumok egymást kiegészítő információt adnak. Bonyolultabb szimmetriájú molekulák esetében az adott rezgések IR- és Raman-aktivitását csoportelmélet segítségével lehet levezetni. (Praktikusan a karaktertáblázatok segítségével állapíthatjuk meg, hogy egy-egy rezgés IR- vagy Raman-aktív-e.) A csoportelméletből levezethető egyszerű szabályként megfogalmazható az ún. *kölcsönös kizárási szabály*, amely szerint inverziós centrummal rendelkező molekulák egy adott rezgése nem lehet egyszerre IR- és Raman-aktív is. Ez a szabály a szerkezetkutatásban is alkalmazható egyszerű vizsgálati módszer annak megállapítására, hogy tartalmaz-e inverziócentrumot a molekula.



8.4. ábra. A szén-dioxid- és a vízmolekula rezgései. A + és – jelek azt mutatják, hogy az adott rezgés aktív-e az IR-, illetve Raman-spektrumban

A fenti kiválasztási szabályok harmonikus esetre, első közelítésben érvényesek. Abban az esetben, ha elég nagy eltérés mutatkozik a harmonikus potenciáltól, akkor a spektrumokban megjelenhetnek az ún. *felharmonikus rezgési* ( $\Delta v = +2$ ), és az ún. *kombinációs átmenetek*. (Az utóbbi esetben egy többatomos molekula két eltérő rezgési módusát jellemző kvantumszáma egyidejűleg változik meg.)

Napjainkban az IR- és Raman-spektrumok rutinszerűen, viszonylag gyorsan és pontosan számíthatók kvantumkémiai módszerekkel. A viszonylag gyors *sűrűségfüggvény* (*density functional theory, DFT*)-módszerek, például a leggyakrabban alkalmazott B3LYP funkcionál is, akár néhány száz-atomos molekulák harmonikus rezgési spektrumának számítását teszi lehetővé, átlagosan 2–4%-os hibával. Mivel a hibák jórészt szisztematikusak, ezért egyszerűen, a rezgési frekvenciák empirikus egyfaktos *skalázásával* jelentősen csökkenthető a hiba. Még jobb egyezést érhetünk el, ha többféle skálafaktort alkalmazunk a különböző (pl. nyújtási és hajlítási) módusokra, vagy ha az erőállandókat skalázzuk különféle skálafaktorokkal. Ez utóbbi a Pulay-féle „*scaled quantum mechanical*” (*SQM*) módszer. A legtöbb kvantumkémiai programcsomag, így a legelterjedtebben alkalmazott Gaussian programcsomag is, ma már lehetővé teszi a harmonikus közelítésen való túllépést az *anharmonicitás perturbációs* elven történő kezelésével. Ez a számítás azonban jóval időigényesebb, a molekula méretétől függően akár egy,

vagy több nagyságrenddel is megnövelheti a számítási időt, így jelenleg mintegy 10–20 atomot tartalmazó molekulák esetében alkalmazható. Bonyolultabb (pl. nyílthéjú, gyenge kötések tartalmazó) molekulák esetében a sűrűségfunkcionál-módszerek helyett indokolt lehet pontosabb, az elektronkorrelációt is figyelembe vevő elektronszerkezeti módszerek, például a „*coupled-cluster*” (CC) módszerek alkalmazása. Ezek a számítások jóval több időt, nagyobb számítógépes kapacitást, és valamivel több előismeretet is igényelnek a felhasználótól, ugyanakkor lehetőséget adnak a számítási szint szisztematikus javítására. A kvantumkémiai programok segítségével IR- és Raman-intenzitásokat is számíthatunk. A számított intenzitások ugyan kevésbé pontosak, mint a frekvenciák, de a kivételektől eltekintve nagyságrendileg megbízhatók, így ezek is nagy segítséget nyújthatnak a spektrumaszignációhoz.

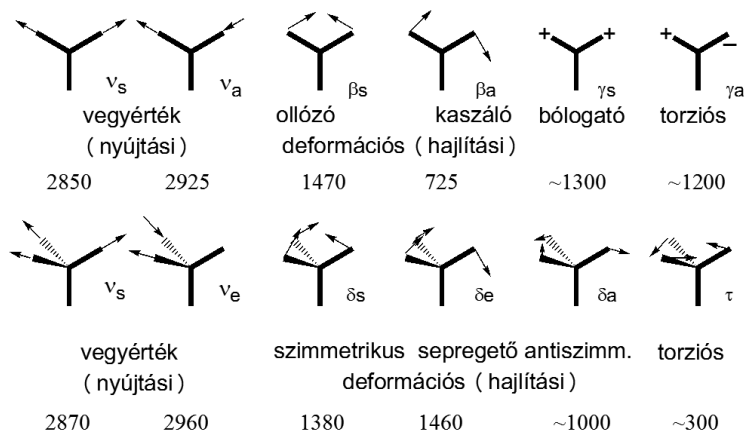
## 8.3. Szerkezeti információk az IR- és Raman-spektrumokban

### 8.3.1. Elsődleges szerkezeti információk: karakterisztikus kötési és csoportfrekvenciák

Az IR- és Raman-spektrumok hozzávetőleges, gyors értelmezését jelentősen megkönnyíti az a tény, hogy egyes sávok számítások és bonyolultabb analízis nélkül is egyértelműen hozzárendelhetők bizonyos kötésekhez, atomcsoportokhoz. Ezeket a molekula többi részétől nagyrészt független rezgési átmeneteket nevezük karakterisztikus frekvenciáknak. Karakterisztikus kötési frekvenciát figyelhetünk meg akkor, ha egy nyújtási rezgés és a molekula többi rezgése közötti csatolás, azaz a rezgések „keveredése” nem jelentős. A csatolás pedig akkor kicsi, ha a molekula egy kötéséhez tartozó erőállandó jelentősen eltér a közelében levő kötések erőállandójától, vagy ha a kötetést alkotó atomok redukált tömege jelentősen eltér a szomszédos kötések alkotó atomok redukált tömegétől. Az első esetre az egyik legjellemzőbb példa az egyszeres C–C kötésekhez (azaz telített szénhidrogénvázhoz, vagy telítetlen váz esetén kumulált helyzetben) kapcsolódó C=O-csoport nyújtási ( $\nu_{\text{CO}}$ ) rezgése. Ez a rezgés a legtöbb sávtól jól elkülönülve, a telített szénváz szerkezetétől függetlenül,  $1700\text{ cm}^{-1}$  környékén intenzív sávként jelenik meg az IR-spektrumokban. (Természetesen a pontos érték függ a szénváz szerkezetétől is, ami további információval szolgál; ld. 8.3.2. fejezet.) Szintén jól elkülönülnek az IR-spektrumban az általában nagyon kis intenzitású, a

Raman-spektrumokban azonban jóval intenzívebb sávként megjelenő karakterisztikus  $C\equiv C$  és  $C\equiv N$  nyújtási rezgések. A környezettől jelentősen eltérő redukált tömegek miatt megjelenő karakterisztikus kötési frekvenciákra példa a szénvázhoz kapcsolódó  $C-Br$  kötések (intenzív IR-sáv  $500-600\text{ cm}^{-1}$  körül), a  $C-I$  kötések (intenzív IR-sáv  $500\text{ cm}^{-1}$  körül), vagy a fémorganikus vegyületek fém–szén nyújtási rezgései.

A jelentősen eltérő redukált tömeg miatt a  $C-H$  nyújtási rezgések is csak nagyon kis mértékben csatolnak a szénváz  $C-C$  kötéseinek nyújtási rezgésével. Ugyanakkor az  $CH_2$ -csoportokon belül a  $C-H$  rezgések kombinálódnak, csatolnak egymással: az azonos fázisban rezgő  $C-H$  nyújtásokat szimmetrikus ( $\nu_s$ ,  $\sim 2850\text{ cm}^{-1}$ ), míg az ellentétes fázisban rezgőket antiszimmetrikus nyújtásnak ( $\nu_{as}$ ,  $\sim 2925\text{ cm}^{-1}$ ) nevezzük. Az ilyen, csoporton belül csatolt rezgéseket pedig karakterisztikus csoportfrekvenciáknak nevezzük. A  $CH_2$ - és a  $CH_3$ -csoportok jellemző csoportfrekvenciáit az 8.5. ábrán foglaljuk össze. Hasonló, jellegzetes szimmetrikus és antiszimmetrikus rezgési frekvenciák jelennek meg például az  $NH_2$ -,  $NO_2$ - és az  $SO_2$ -csoportok esetében is.



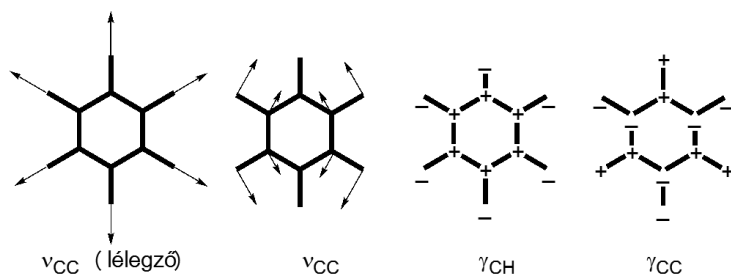
8.5. ábra. A  $CH_2$ - és  $CH_3$ -csoportok karakterisztikus csoportrezgései, és ezek hozzávetőleges hullámszámértéke  $\text{cm}^{-1}$ -ben

Nem azonos típusú rezgések csatolásából létrejövő csoportfrekvenciák egyik legjellemzőbb példája az amidok csoportfrekvenciái. Mivel az amidcsoportban a N-atom magános elektronpárja és a  $C=O$  kötés  $\pi$ -elektronjai delokalizált rendszert hoznak létre, ezért az egyszeres kötésnél erősebb  $C-N$  kötés és a kétszeres kötésnél gyengébb  $C=O$  kötés nyújtási rezgései viszonylag erősen kombinálódnak. A  $C=O$  nyújtási rezgés ( $\nu_{CO}$ ,  $\sim 80\%$ ) és a  $C-N$  nyújtási rezgés ( $\nu_{CN}$ ,  $\sim 20\%$ ) kombinációjával létrejövő rezgést nevezzük amid-I rezgésnek ( $1630-1710\text{ cm}^{-1}$ ). Az amid-II



(1510–1620  $\text{cm}^{-1}$ ) az XNH hajlítási rezgés ( $\beta\text{CNH}$ , ~60%) és a C–N nyújtási rezgés ( $\nu\text{CN}$ , ~20%), míg az amid-III (1200–1420  $\text{cm}^{-1}$ ) a C–N nyújtási rezgés ( $\nu\text{CN}$ , ~40%), a XNH hajlítási rezgés ( $\beta\text{CNH}$ , ~30%), valamint a C=O nyújtási rezgés ( $\nu\text{CN}$ , >25%) kombinációja. [Megjegyezzük, hogy az amidoknál további három rezgést szokás római számmal jelölni, amid-IV (620–770  $\text{cm}^{-1}$ ): elsősorban N–C=O hajlítás ( $\beta\text{NCO}$ ), -V (535–610  $\text{cm}^{-1}$ ) és -VI (~200  $\text{cm}^{-1}$ ): az amidsíkra merőleges torziós rezgések ( $\gamma\text{NH}$  és  $\gamma\text{CO}$ ), amid-A-val és -B-vel (~3300, illetve ~3100  $\text{cm}^{-1}$ ) jelölik az N–H nyújtás(oka)t.]

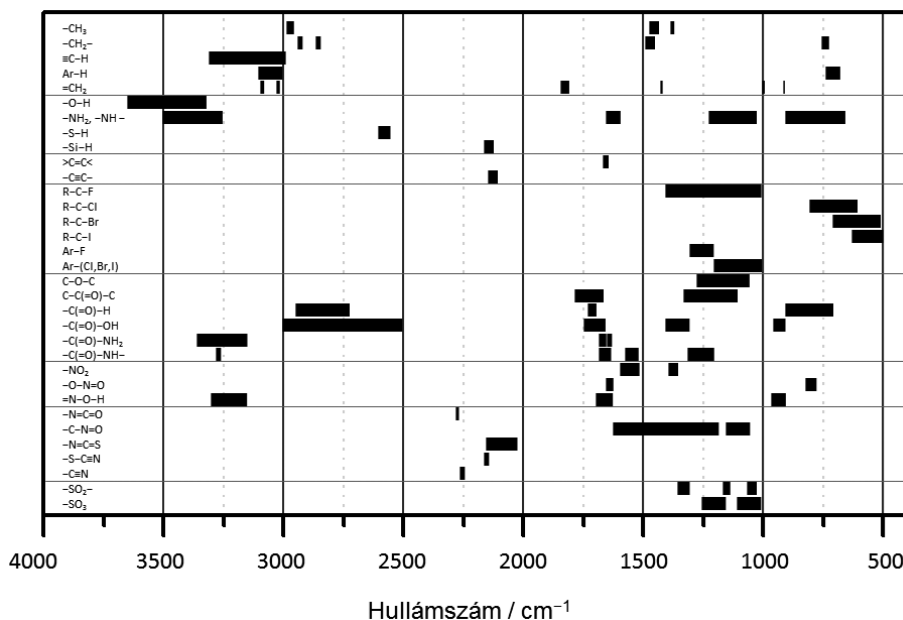
Még bonyolultabb csatolásokkal is kialakulhatnak karakterisztikus frekvenciák, ilyenek például az aromás gyűrűrezgések (vagy vázrezgések). A benzol legegyszerűbb rezgési módusa az ún. lélegző rezgés (8.6. ábra), amelyben az összes C–C rezgés egy fázisban, szimmetrikusan nyúlik. Ez a rezgés a Raman-spektrumban intenzív sávként jelentkezik 992  $\text{cm}^{-1}$ -nél, míg az IR-spektrumban a szimmetriának (és az ebből levezetett kölcsönös kizárási szabálynak) megfelelően nem jelenik meg. Az IR-spektrumban aktívak és intenzív, jellemző éles sávként jelennek meg az 1650–1400  $\text{cm}^{-1}$ -es tartományban a C–C nyújtási rezgések alacsonyabb szimmetriájú csatolásával előálló egyes vázrezgések. Szintén jellemzőek az aromás vegyületek síkra merőleges csatolt deformációs C–C ( $\gamma\text{CC}$ ) és C–H ( $\gamma\text{CH}$ ) rezgései (900–650  $\text{cm}^{-1}$ ). Az utóbbiak csatolási sémája függ a szubsztitúciótól, így alkalmasak az aromás gyűrűhöz kapcsolódó szubsztituensek helyének megállapítására.



8.6. ábra. A benzolgyűrű néhány vázrezgése

Összefoglalásképpen elmondható, hogy egyszerű szerves vegyületek esetében az IR- és Raman-spektrumok „ránézésre” elárulják a fontosabb funkciós csoportok jelenlétét vagy hiányát a vizsgált vegyületben. A legfontosabb karakterisztikus rezgési és csoportfrekvenciákat a 8.7. ábrán foglaljuk össze. A spektrumértékelést érdemes az 1400  $\text{cm}^{-1}$  feletti tartományban kezdeni. Az 1400  $\text{cm}^{-1}$  és 400  $\text{cm}^{-1}$  tartományban a szénváz erősen csatoló rezgései jelennek meg, amelyek a váz kis

változtatásakor (akár csak eltérő konformáció esetén) is viszonylag jelentősen változhatnak. Rendelkezésre álló referencia spektrum esetében ezért ez a tartomány a legalkalmasabb a molekula pontos azonosítására. Az IR- és Raman-spektrumok kiértékelését számos nyomtatott és digitális spektrumkönyvtár segíti. Ezek egy része szisztematikusan és részletesen összefoglalja a karakterisztikus frekvenciákat is.<sup>8</sup>



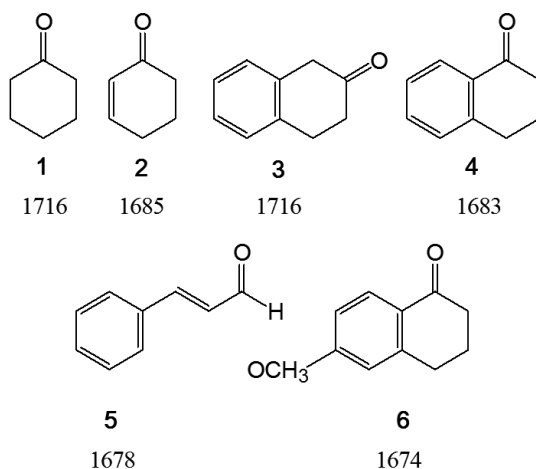
8.7. ábra. Főbb funkciós csoportok karakterisztikus rezgési és csoportfrekvenciái (az IR-spektrumokban kis intenzitással megjelenő sávok nincsenek jelezve)

### 8.3.2. További szerkezeti információk

Szintén fontos további szerkezeti információt nyújthat az, ha a molekula egy karakterisztikus frekvenciája számottevően eltér a szokásos, átlagos értéktől, vagy ha csatolások miatt felhasad a sáv.

Ezek közül az egyik legjelentősebb hatás a konjugáció vagy delokalizáció. Ahogy a 8.8. ábrán is látható, a ciklohexanon (**1**) C=O (νCO) nyújtási sávja a telített ketonokra jellemző 1716 cm<sup>-1</sup>-es értéknél található. Ezzel szemben a 2-ciklohexén-1-on (**2**) νCO sávja a jelentős konjugáció miatt több mint 30 hullámszámmal lejjebb, 1685 cm<sup>-1</sup>-nél jelenik meg, míg a C=C nyújtási rezgési sávja az izolált C=C kötés nyújtási rezgési sávjánál (1617 cm<sup>-1</sup>-nél) intenzívebben jelentkezik a spektrumban. Az

izolált C=O-csoportot tartalmazó 3,4-dihidronaftalin-2(1H)-on (**3**) vCO sávja szintén  $1716\text{ cm}^{-1}$ -nél, míg a benzolgyűrűvel konjugált helyzetben levő C=O-csoportot tartalmazó izomere, a 3,4-dihidronaftalin-1(2H)-on (**4**) vCO sávja  $1683\text{ cm}^{-1}$ -nél található. A konjugált szerkezet kiterjedésével a C=O nyújtási frekvencia még lejjebb tolódik, a fahéjaldehidben (**5**) már  $1678\text{ cm}^{-1}$ -nél jelenik meg a vCO sáv.

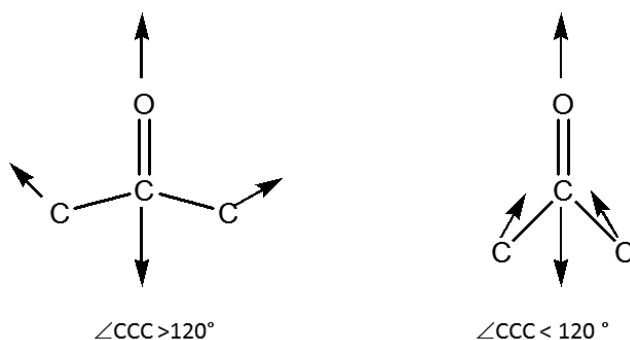


8.8. ábra. Néhány vegyület C=O (vCO) nyújtási sávjának hullámszáma  $\text{cm}^{-1}$ -ben

Az oxocsoporthoz kapcsolódó elektronszívó csoport erősíti a C=O kötést, míg az elektronszívó csoportok az ionos  $\text{C}^+-\text{O}^-$  határszerkezetet erősítik. Ennek megfelelően az ecetsav C=O (vCO) sávja  $1729\text{ cm}^{-1}$ -nél, a  $-I$  induktív effektusú szubsztituenseket tartalmazó triklórecetsav vCO sávja  $1768\text{ cm}^{-1}$ -nél jelentkezik. Az elektronszívó metoxicsoporthoz tartozó 6-metoxi-3,4-dihidronaftalin-1(2H)-on (**6**) vCO jele pedig a 3,4-dihidronaftalin-2(1H)-on (**3**) vCO sávjához képest közel  $10\text{ cm}^{-1}$ -gyel lejjebb,  $1683\text{ cm}^{-1}$  helyett  $1674\text{ cm}^{-1}$ -nél található meg.

A telített szénhidrogénygyűrűhöz kapcsolódó oxocsoport vCO sávja a gyűrű tagszámáról is ad információt. A hatos gyűrűtől a hármas gyűrűig a szubsztituátlan cikloalkanonok vCO sávja rendre  $1716\text{ cm}^{-1}$ ,  $1744\text{ cm}^{-1}$ ,  $1816\text{ cm}^{-1}$  és  $1822\text{ cm}^{-1}$ -nél jelenik meg. Ezt a tendenciát kvalitatívan meg lehet magyarázni a csatolások segítségével. A C=O nyújtás ugyan kis mértékben, de csatolhat mind a szomszédos C–C kötések nyújtási (vCC) rezgésével, mind a C–C–C hajlítási (vagy deformációs,  $\beta\text{CC}(\text{O})\text{C}$ ) rezgéssel. Ugyan mindkét rezgés frekvenciája kisebb, mint a vCO frekvencia, ezért mindkét csatolás a kisebb hullámszámok felé tolja a vCO rezgés frekvenciáját, de a kisebb C–C–C frekvenciájú hajlítási rezgéssel való csatolás nagyobb mértékben csökkenti a frekvenciát. Két

rezgés csatolásának mértéke attól is függ, hogy a két rezgéshez tartozó elmozdulás vektorok mennyire mutatnak azonos irányba; minél jobban egyezik a két vektor iránya, annál nagyobb a csatolás mértéke. Ahogy a 8.9. ábrán kvantitatívan bemutatjuk, a gyűrű tagszámának csökkentésével a  $\nu\text{CO}$  vektor iránya egyre inkább a  $\nu\text{CC}$  vektorok irányával egyezik meg és egyre kevésbé egyezik a  $\beta\text{CC}(\text{O})\text{C}$  vektorok irányával, azaz egyre nagyobb a  $\nu\text{CO}$  csatolása a C–C nyújtási rezgésekkel és egyre kisebb a  $\beta\text{CC}(\text{O})\text{C}$ -vel, így a frekvencia lejjebb tolódik. Ezzel összhangban, a szterikus okok miatt laposabb C–C–C szögű  $(\text{CH}_3)_3\text{CC}(=\text{O})\text{C}(\text{CH}_3)_3$  molekula  $\nu\text{CO}$  sávja a ciklohexanon  $\nu\text{CO}$  sávjánál kisebb hullámszámmal,  $1685\text{ cm}^{-1}$ -nél jelentkezik.



8.9. ábra. A C=O ( $\nu\text{CO}$ ) nyújtás csatolása és a szénváz többi rezgése közötti csatolás függése a  $\angle\text{CCC}$  szögtől

Fémorganikus karbonilok  $\text{C}\equiv\text{O}$  nyújtási rezgésének ( $\nu\text{CO}$ ) hullámszáma fordítottan arányos a fémen található elektronsűrűséggel. A fém–szén kötés ugyanis két részből tevődik össze. Egyrészt a szén-monoxid szénatomjának magános elektronpárja koordinálódik a fém üres d-pályájára ( $n\rightarrow d$   $\sigma$ -kötés), másrészt a fém egy betöltött d-pályáján levő elektronpár koordinálódik (viszontkoordináció) a szén-monoxid  $\pi^*$ -pályájára ( $d\rightarrow\pi^*$   $\pi$ -kötés). Az utóbbi annál jobban erősíti a fém–szén kötetést, minél nagyobb a fémen az elektronsűrűség. Ezzel együtt azonban – mivel a szén-monoxid lazító pályájára történik koordináció – gyengíti a  $\text{C}\equiv\text{O}$  kötetést, azaz csökkenti a  $\nu\text{CO}$  frekvenciát. Ennek megfelelően a szabad CO, a  $\text{Ni}(\text{CO})_4$ , a  $\text{Co}(\text{CO})_4^-$  és a  $\text{Fe}(\text{CO})_4^{2-}$   $\nu\text{CO}$  rezgései rendre 2143, 2060, 1890 és  $1790\text{ cm}^{-1}$  értéknél jelennek meg. Ha a fémhez szén-monoxidon kívül más ligandum is kapcsolódik, akkor a  $\nu\text{CO}$  frekvencia segítségével „mérhető” a ligandum induktív effektusának erőssége. Például az  $\text{LNi}(\text{CO})_3$  összetételű komplexeknél mért  $\nu\text{CO}$  frekvencia alapján a következő sorrend állítható fel az (L) ligandumok csökkenő mértékű +I induktív hatására:

$\text{P}^i\text{Bu}_3$  ( $2056\text{ cm}^{-1}$ ) >  $\text{PMe}_3$  ( $2064\text{ cm}^{-1}$ ) >  $\text{PPh}_3$  ( $2069\text{ cm}^{-1}$ ) >  $\text{POMe}_3$  ( $2080\text{ cm}^{-1}$ ) >  $\text{PF}_3$  ( $2111\text{ cm}^{-1}$ ).

Két azonos vagy hasonló csoport csatolásának mértéke a molekula térszerkezetére, konformációjára is adhat támpontot. Példaként egy  $\beta$ -redő szerkezetű peptidben az amidcsoportok egy síkban vannak, míg egy  $\alpha$ -hélix szerkezetű peptidben kb.  $60^\circ$ -os szöget zárnak be. Ennek megfelelően a  $\beta$ -peptidekben erősebb a C=O-csoportok (precízebben: amid-I rezgések) csatolása, így nagyobb a sávok csatolás miatti felhasadása. (Meg kell azonban jegyezni azt, hogy az egyéb effektusok, valamint az egyszerű mérési technikák esetében a spektrumok kisebb felbontása következtében a csatolás miatti felhasadás a konformációs azonosításra csak korlátozottan alkalmazható.)

Nemcsak két alaphang, hanem egy alaprezgés és ennek az alaprezgésnek a frekvenciájához közel eső másik rezgés felharmonikusa is kombinálódhat. Egy alaprezgés és egy másik rezgés első felharmonikusának csatolását Fermi-rezonanciának nevezzük. Az aldehidek esetében például a csatolatlan C–H nyújtási rezgést  $2800\text{ cm}^{-1}$  körül váránk. Az O=C–H deformációs rezgés  $\sim 1400\text{ cm}^{-1}$ -nél jelenik meg, így felhangja  $2800\text{ cm}^{-1}$ -re esik. A C–H nyújtási rezgés alaphangja és az O=C–H deformációs felhangja Fermi-rezonanciába lépve két, összemérhető intenzitású sávot eredményez  $2700\text{ cm}^{-1}$  és  $2900\text{ cm}^{-1}$  körül. Fermi-rezonancia hiányában nemcsak hozzávetőlegesen egy helyen váránk a két sávot, hanem a felhang intenzitása – a kiválasztási szabályoknak megfelelően – is csekély lenne. Az aldehidekben fellépő Fermi-rezonancia alkalmas az aldehidek és ketonok megkülönböztetésére.

A rezgési spektroszkópiai módszerek kiválóan alkalmazhatók hidrogénkötések megfigyelésére, tanulmányozására. Minél erősebb az  $\text{Y}\cdots\text{H}\cdots\text{X}\cdots\text{Z}$  kötésrendszerben az  $\text{Y}\cdots\text{H}$  hidrogénkötés, annál nagyobb mértékben gyengíti a H–X kötést. Ennek eredményeképpen a H–X nyújtási frekvencia (egy-egy speciális, gyenge  $\text{Y}\cdots\text{H}$  kötések leszámítva) kisebb hullámszámok felé tolódik el. Mivel kis távolságbeli különbség vagy a térbeli pozíció kis eltérése is jelentősen eltérő erősségű hidrogénkötéseket eredményezhet, ezért – különösen folyadékfázisban – a hidrogénkötések kialakulása jelentős sávki szélesedést is eredményez. Karbonsavak szilárd vagy folyadékfázisú spektrumánál az O–H nyújtási sáv szélessége kb.  $1000\text{ cm}^{-1}$  ( $\sim 3300\text{--}2300\text{ cm}^{-1}$ ). Abban az esetben, ha aprotikus oldószerben, egyre nagyobb hígítás mellett vesszük fel a rezgési spektrumot, akkor az intermolekuláris hidrogénkötés esetében a H–X nyújtási rezgés maximuma egyre nagyobb hullámszámérték felé tolódik, miközben élesedik a sáv. Ez lehetőséget nyújt az inter- és intramolekuláris hidrogénkötések

megkülönböztetésére. Mivel a H–X–Z szöget kis mértékben kimerevíti az  $Y \cdots H$  hidrogénkötés, ezért a H–X nyújtási rezgéssel ellentétben, a hidrogénkötésben levő molekula H–X–Z hajlítási rezgése nagyobb hullámszám felé tolódik el. Ez az eltolódás, és e sávnak a kiszélesedése azonban jóval kisebb mértékű a  $\nu_{HX}$  sávnál megfigyelhetőhöz képest.

Kristályos anyagok esetében a kristályok eltérő szimmetriája eltérő relatív intenzitású sávokat eredményezhet. Erre az egyik legszebb példa a  $CaCO_3$  két különböző kristályának, a kalcitnak és az aragonitnak az eltérő IR-spektruma. Mivel a  $CO_3^{2-}$  lélegző rezgése során nem változik a dipólusmomentum, így az izolált karbonátion e rezgése nem jelenik meg az IR-spektrumban. A pakolódástól függően azonban a kristályban levő  $CO_3^{2-}$  környezetében eltérő, kisebb szimmetria jelentkezhethet, mint az izolált ionok esetében. A kalcitkristályban a karbonátionok körül megmarad a háromfogású szimmetria, az aragonitban azonban ez hiányzik. Így a kalcit IR-spektrumában nem jelenik meg, míg az aragonitban megjelenik a lélegző rezgés sávja. [Csoportelméleti fogalmakkal élve a  $D_{3h}$  pontcsoportba tartozó szabad  $CO_3^{2-}$  az ortorombos,  $2/m\ 2/m\ 2/m$  ( $D_{2h}^1$ ) aragonit kristályba beépülve alacsonyabb,  $D_{2h}$  faktorcsoporthoz tartozó szimmetriájú. Ezzel szemben a kalcit trigonális,  $\bar{3}\ 2/m$  ( $D_{3d}$ ) szimmetriájú kristályba épülve  $D_{3d}$  faktorcsoporthoz tartozó szimmetriájú.]

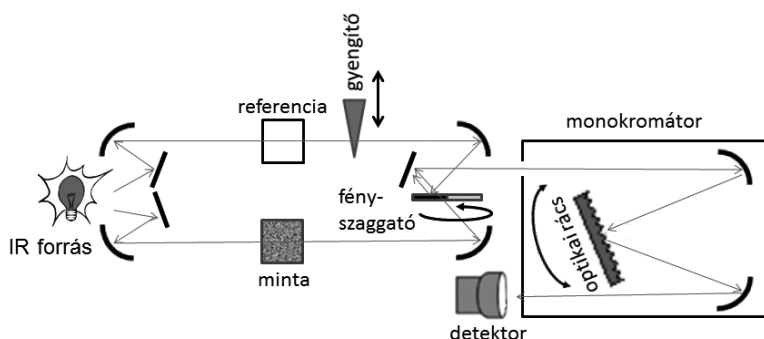
## 8.4. Műszerek és spektrumfelvételi technikák

### 8.4.1. IR-spektrométerek

Felépítésük alapján az IR-spektrométereknek két fő típusa van, a diszperziós és a Fourier-transzformációs készülékek. Elsősorban a számítógépes kapacitás gyors fejlődésének köszönhető, hogy a rutin alkalmazásokban a diszperziós készülékeket a XX. század végére szinte teljesen kiszorították a Fourier-transzformációs készülékek.

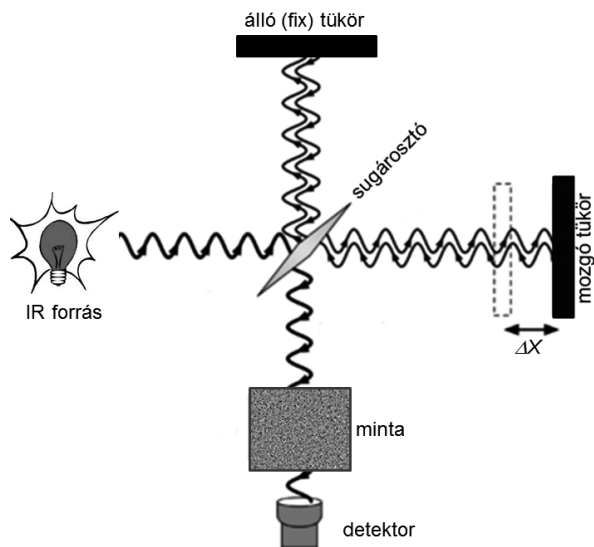
A *diszperziós készülékek* döntő többsége *két fénypálya*, azaz a forrás után a fénypályát egy sugárosztó két irányba, a minta és a referencia (pl. üres mintatartó) felé ereszti át, illetve reflektálja (8.10. ábra). A mintán, illetve a referencián áthaladva a két fénypálya egy chopper (forgó szektortükör) segítségével, a chopper által megadott frekvenciával váltakozva jut tovább a monokromátor, majd a detektor felé. A monokromátorral kiválasztott hullámhosszon a két nyaláb intenzitáskülönbségét detektálják. (A gyakorlatban ez történhet úgy, hogy egy ék alakúan kiképzett abszorbeáló anyagot a referencia sugárútba, a megfelelő mélységig

becsúsztatva kompenzálják a minta adott frekvencián történő elnyelését.) A monokromátorral hullámhossz szerint pásztázva vehető fel a teljes spektrum.



8.10. ábra. Egy kétutas diszperziós IR-készülék egyszerűsített vázlatja

A *Fourier-transzformációs készülékek* leggyakrabban egy fényutas felépítésűek, a minta mérését a referencia mérése előzi meg, amelynek spektrumát a számítógép tárolja. A forrás után a tükrökkel párhuzamosított sugárnyaláb az interferométerre kerül. Az interferométer egy sugárosztóból, egy álló és egy mozgó tükörből áll, a 8.11. ábra szerinti elrendezésben. A fény így két sugárúton halad keresztül az interferométeren, majd jut tovább a mintára, végül pedig a detektorra: forrás → sugárosztó → álló tükör → sugárosztó → minta → detektor, illetve forrás → sugárosztó → mozgó tükör → sugárosztó → minta → detektor. Az interferométer alapvető működését a 8.12. ábra segítségével érthetjük meg. Abban az esetben, ha monokromatikus fény halad keresztül az interferométeren, és az álló és mozgó tükör sugárosztótól mért távolsága megegyezik, akkor a két fénynyaláb azonos utat tesz meg. Ekkor a fényhullámok azonos fázisban kerülnek a detektorra, ezért erősítik egymást. A mozgó tükröt elmozgatva úthosszkülönbség hozható létre.  $1/2\lambda$ ,  $3/2\lambda$ ,  $5/2\lambda$ , ... esetében a hullámok teljesen kioltják egymást, míg  $0$ ,  $\lambda$ ,  $2\lambda$ , ... esetében erősítés jön létre. Így a mozgó tükör helyzetének a függvényében egy koszinuszgörbét kapunk, ez a monokromatikus fény interferogramja, amelyből közvetlenül meghatározhatjuk a monokromatikus fény hullámhosszát. Nem monokromatikus fény esetében az interferogram a fényben található különböző hullámhosszú fények által létrehozott koszinuszgörbék összege. A bonyolult, véges és nem folytonos (azaz diszkrét mérési pontokból álló) interferogramból diszkrét Fourier-transzformációval nyerhető a spektrum. A diszkrét Fourier-transzformáció matematikájából következik, hogy az



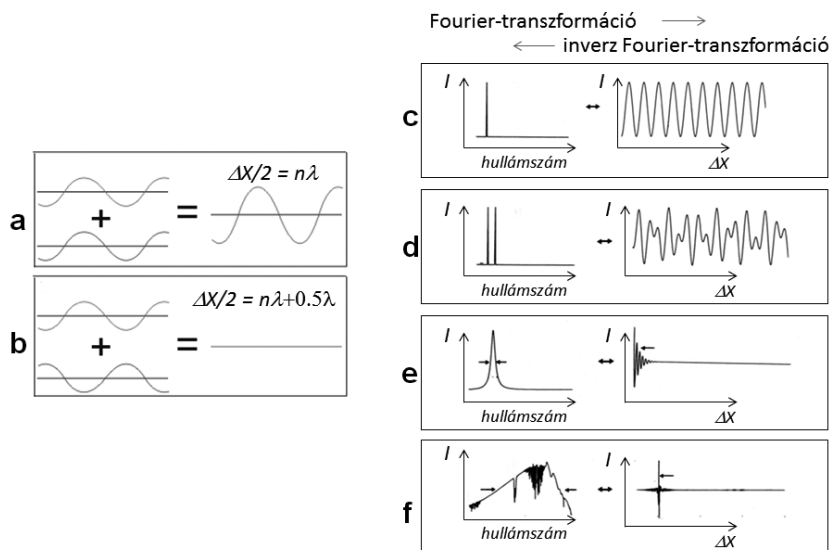
8.11. ábra. Egy Fourier-transzformációs IR-készülék egyszerűsített vázlata

interferogram hossza a spektrum felbontását, míg a mintavételi sűrűség (azaz az interferogram felbontása) a spektrum tartományának szélességét szabja meg. A Fourier-transzformációs készülékek fő előnyei a diszperziós készülékekkel szemben a következők: 1) egyszerűbb optikai felépítés; 2) Connes-előny: belső kalibráció (a mozgó tükör pontos helyzetét egy jól ismert hullámhosszú He-Ne lézer interferogramjából határozzák meg, míg egy diszperziós készüléknél a monokromátort időről-időre kalibrálni kell); 3) Jacquinot-előny: nincs bennük rés (a diszperziós készülékeknél a felbontást a monokromátor be- és kilépő rése, valamint az optikai rács határozza meg); 4) Fellgett- vagy multiplex-előny: az interferogram minden mérési pontja a spektrum minden pontjáról tartalmaz információt, így ugyanolyan mérési idő mellett jobb a jel/zaj viszony.

IR-spektrométerekben régebben sugárforrásként Nernst-lámpát alkalmaztak, amelyben egy cirkónium-oxid és ittrium-oxid tartalmú kerámiát fűtöttek. Jelenleg a MIR-tartományban (illetve a NIR- és FIR-tartomány MIR-tartományhoz közelebb eső felében) legelterjedtebben Globar-izzót (SiC) alkalmaznak. A NIR-tartományban W-lámpa, míg a FIR-tartományban Hg-lámpa alkalmazható.

Az infravörös detektorokat két nagy csoportba lehet osztani: termikus és félvezető detektorok. A termikus detektorok közül leginkább a piroelektromos detektorok terjedtek el. Ezekben a belépő infravörös sugárzás dipólusos molekulák rendezettségét változtatja meg, ami az





8.12. ábra. A Fourier-transzformációs készülékek működési elvének szemléltetése. Hullámok erősítése (a) és teljes kioltása (b). Egy monokromatikus sugárzás és interferogramja (c), sugárzás két hullámhosszon, és ennek interferogramja (d), véges szélességű sáv és interferogramja (e), valamint egy egyutas IR-spektrum és interferogramja (f)

ezekből a molekulából kialakított réteg kapacitásváltozásaként mérhető. Leggyakrabban a piroelektromos deuterált triglicil-szulfát (DTGS)-detektorral, illetve ennek továbbfejlesztett változataival találkozhatunk a spektrométerekben. Szintén a termikus detektorok közé sorolhatók a FIR-tartományban használt bolométerek, amelyekben az IR-sugárzás egy vékonyrétegben (pl. fémbevonat) effektíven elnyelődik, és a vékonyréteg hőmérséklet-emelkedését mérik. A félvezető detektorokban az IR-fotonokkal gerjesztett elektronok miatt létrejövő feszültséget (fotovoltaikus detektorok), vagy a vezetés változását (fotokonduktív detektorok) mérik. Legelterjedtebben használt félvezető detektorok az MCT- (higany-kadmium-tellúr) és az InSb-detektor. A piroelektromos detektorok előnye, hogy nem igényelnek kriogén hűtést és nagy tartományt fognak át. Ezzel szemben a félvezető detektorok jóval érzékenyebb detektálást tesznek lehetővé.

A kovalens kötésű vegyületek intenzív sávjai a MIR-tartományra esnek, ezért ebben a tartományban sókristályablakokat lehet optikai elemként, mintatartóként alkalmazni. Legelterjedtebb a KBr, amely a teljes MIR- és NIR-tartományban átereszt. Szintén gyakran alkalmazzák

az olcsóbb, de a MIR alsó pár száz  $\text{cm}^{-1}$ -es tartományában elnyelő NaCl-ot, valamint a lágy, széles tartományban (a NIR és a FIR felső részében is) használható CsI-ot, továbbá az egyébként kiváló, de rendkívül mérgező (KRS-5 márkanevű) TlI/TlBr-ot. Víztartalmú minták esetén előnyös a szűk tartományban áteresztő, de nem higroszkópos  $\text{CaF}_2$  és  $\text{BaF}_2$  használata. Mivel az egyébként is nagyon kis intenzitású Si–O nyújtási felhangja még a MIR-tartományra esik, ezért a NIR-tartományban a kvarc kiváló optikai anyag. Ez lehetőséget nyújt üvegszáloptika használatára is, amellyel a NIR-sugárzás kényelmesen bevezethető reaktorokba, lehetőséget teremtve reakciók *in situ* spektroszkópiai nyomon követésére is. A FIR-tartományban leginkább Si- és Ge-kristályt, valamint polietilént lehet alkalmazni.

Nemcsak a higroszkópos optikai elemek miatt, hanem a légköri víz és szén-dioxid intenzív rezgési-forgási sávjai miatt is az IR-készülékeket száraz levegővel vagy nitrogéngázzal kell öblíteni. Főleg a FIR-tartományban alkalmaznak vákuumozható készülékeket.

## 8.4.2. IR-spektrumfelvételi technikák

Az IR-spektroszkópia spektrumfelvételi módszereit négy nagy csoportba lehet sorolni: *transzmissziós*, *reflexiós*, *emissziós* és *akusztikus* technikák.

Rutin IR-spektroszkópiai mérésekben a *KBr-pasztillás transzmissziós technika* az egyik legjelentősebb. Ennél a módszernél a mintát nagyságrendileg 100-szoros hígításban KBr-hoz keverik, majd őrlés után vákuum alatt pasztillába préselik. (Az őrlésnek a homogenizáláson kívül az a szerepe, hogy csökkenti a szemcseméretet, így a minta fényszórását. A vákuum alkalmazása a szintén fényszóró levegőzárványok kiküszöbölése miatt szükséges.) A préselés során alkalmazott nagy nyomás miatt figyelembe kell venni, hogy sók esetében az ionok cserélődhetnek, így például egy szerves kloridsó esetében a megfelelő bromid is megjelenhet a spektrumban.

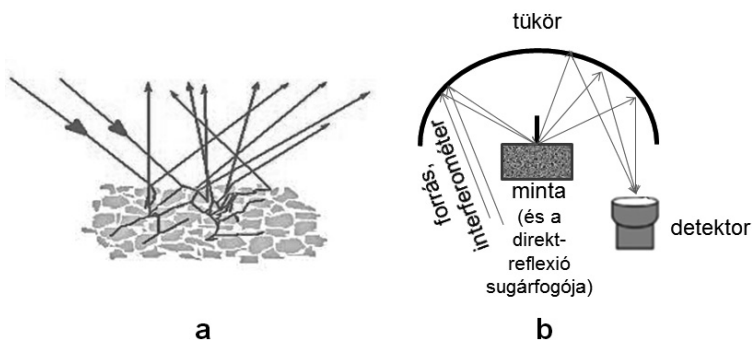
Viszonylag elterjedten alkalmazzák a *transzmissziós filmtechnikákat* is. Ekkor szilárd anyagok, különösen szilárd polimerek esetében vékony filmet mérnek közvetlenül. Szerves anyagok esetében gyorsan párolgó oldószerrel készült oldatot sókristályra cseppentenek, majd az oldószert beszárítják. Hígítatlan folyadékokat két sókristály közé préselve lehet filmként mérni.

Főleg a KBr-pasztillás technika elterjedése előtt volt népszerű a *szuszpenziós technika*. Ennél a módszernél leggyakrabban nujolban

(paraffinolajban) szuszpendálják a mintát és két sókristály között filmként veszik fel a spektrumot. Mivel a nujolnak több elnyelése is van az IR-tartományban, ezért a hiányzó tartományt más szuszpendálószer segítségével, pl. fluorolub-bal (perfluorozott szénhidrogén) kell felvenni.

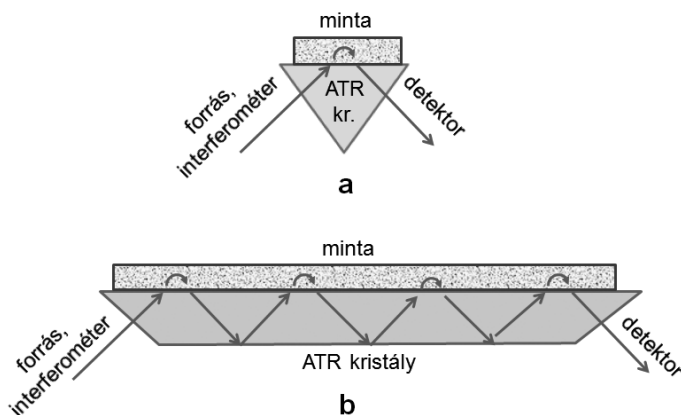
*Oldatok vizsgálata* esetében szintén számolni kell az oldószer elnyelésével, így a teljes spektrum felvétele is több oldószer segítségével oldható meg. Ideális oldószerek a kevés rezgési átmenettel rendelkező kismolekulák (pl.  $\text{CHCl}_3$ ,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ,  $\text{CCl}_4$ ), kerülendőek viszont a gazdag IR-spektrumú aromás vegyületek. Az oldatokat fix vagy változtatható, nagyságrendileg néhány 10–100  $\mu\text{m}$  vastagságú sókristályablakkal felszerelt mintatartóban (küvetában) mérhetjük. Hasonló, de lényegesen vastagabb, vagy tükrök segítségével speciális hosszúútas küvetákban lehet gázokat is mérni. Csatolt technikákhoz, reakciók követéséhez átfolyó küvetákat lehet alkalmazni.

A reflexiós technikákat két csoportra oszthatjuk: *belső és külső reflexiós* technikák. A külső reflexiós technikák közül legegyszerűbb az ún. *spekuláris reflexió (SR)*, azaz a minta sík felületéről visszavert és részben elnyelt fény spektrumának a felvétele. *Reflexiós-abszorpciós IR-spektroszkópiai (RAS, IRRAS, vagy RAIRS)* mérésről beszélünk akkor, ha tükröződő felületre viszünk fel vékonyréteget, amelyen a tükröződés előtt és után is keresztülhalad a minta. Sűrűlő szögben mérve akár monomolekuláris réteg vizsgálatára is lehetőség nyílik, amely kiváló módszer a heterogén katalízis mechanizmusának felderítésére. A gyógyszer-analitikában leginkább alkalmazott külső reflexiós módszer a *diffúz reflexió (DR, DRIFTS)*, amelynél a porminta (vagy tablettá) apró szemcséiről sokszorosán szóródó fényt homorú tükrökkel vagy nagy felületen kialakított detektorral gyűjtik össze. A DRIFTS sokféle megvalósítási lehetősége közül egyet mutat be a 8.13. ábra.



8.13. ábra. A diffúz reflexió (a) és a diffúz reflexiós (DRIFTS) mérés egy lehetséges kivitelezése (b)

A gyengített totálreflexió (vagy csillapított teljes reflexió, *attenuated total reflexion, ATR*) belső reflexiós módszer. Manapság a KBr-pasztyillás technika mellett ezt a módszert alkalmazzák leggyakrabban rutin-mérésekre. Az IR-fényt egy nagy törésmutatójú segédkristályba vezetik, amelynek a felületén helyezkedik el a minta (8.14. ábra). Az IR-fényt olyan szögben vezetik be a kristályba, hogy az a mintakristály határfelületen teljes reflexiót szenvedjen. Mivel a reflexió során a fény behatol a minta kis térfogatába, ezért a minta elnyelésének hullámhosszain kis mértékben gyengül, ezt észleljük a spektrum felvétele során.



8.14. ábra. Egy- (a) és többreflexiós (b) ATR-mérőfej

A transzmissziós spektrumokkal való összevethetőség érdekében az ATR-spektrumokat hullámhosszfüggő transzformációnak vetik alá. Azoknál a mintáknál, amelyeknek gyenge az elnyelése, olyan ATR-feltétet érdemes használni, amelynél az IR-sugarat többször reflektáltatják a határfelületen. Mivel a behatolás mélysége (tipikusan 0,5–2 nm) függ a beesési szögtől és a hullámszámtól, ezért ez korlátozott mértékben lehetőséget ad mélységi profilok vizsgálatára.

Az ATR-kristály kiválasztásánál fontos szempont, hogy nagy legyen a törésmutató. A leggyakrabban használt kristályok közé tartozik a KRS-5, ZnSe, Ge és a gyémánt. A gyémánt nagy előnye az is, hogy keménysége miatt a fizikai kopással nem kell számolni, a kémiai inertsége pedig lehetővé teszi reaktív, oxidatív, savas és lúgos minták vizsgálatát is. Az ATR módszer előnye az is, hogy gyors, hiszen minimális minta-előkészítést igényel. Továbbá a transzmissziós mérésekkel szemben (töményebb) vizes oldatok vizsgálatára is lehetőséget ad, és a minta kvantitatívan visszanyerhető. Az ATR-technika kiválóan alkalmas reakciók *in situ* nyomon követésére is, az erre a célra speciálisan kialakított gyémántfejet

el lehet helyezni a reakcióterben. Hátrányok között kell említeni, hogy egyes ATR-kristályoknak is van elnyelése a MIR-tartományban, például a gyémánt 1900 és 2200  $\text{cm}^{-1}$  között elnyel, ami például a fémkarbonilok vizsgálatát kizárja. (Általában a kis gyémántkristályt ZnSe-kristályba ültetik be, amely a MIR-tartományban kb. 550  $\text{cm}^{-1}$  felett engedi át a fényt.) Fontos megjegyezni, hogy az ATR-es méréseknél a minta felületéről, míg transzmissziós méréseknél a minta egész térfogatáról vesszük fel a spektrumot.

Az emissziós IR-technikáknál a minta egyben a sugárforrás is. Leginkább forró gázokat (kipufogó gázokat, füstöket, csillagok fotoszféráját) vagy felhevített szilárd anyagokat vizsgálnak ezzel a módszerrel. A gyógyszer-analitikában nincs nagy jelentősége.

Szerves molekulák esetében az infravörös sugárzást közvetlenül a molekulák rezgése nyeli el, de ez gyorsan disszipálódik a mintában, amely a minta felmelegedését eredményezi, ennek következtében pedig a minta kitágul. Ha a fényt szaggatva (vagy FT-IR-készülékeknél az interferométer mozgó tükrének pásztázása közben) engedjük a mintára, akkor elnyelés esetén a minta a fény szaggatásának frekvenciájában kitágul és összehúzódik. A minta pedig az azt körülvevő levegőben vagy inert gázban sűrűsödéseket, azaz hanghullámokat hoz létre, ami egy érzékeny mikrofonnal detektálható (*akusztikus* technika). A szaggatás frekvenciájának változtatásával elérhető az, hogy a minta más-más mélységéből kapjunk információt, azaz lehetővé teszi mélységprofil felvételét is.

### 8.4.3. Raman-spektrométerek

A lézerek 1960-as évekbeli felfedezése és elterjedése előtt a Raman-spektrométerek forrása általában higanylámpa volt. Leginkább a Hg 435,8 és 404,7 nm-es sugárzását használták, amelyet optikai szűrővel vagy monokromátorral választottak ki a többi Hg-vonal közül. A mai Raman-spektrométerek lézert használnak forrásként. Legelterjedtebben az argonionlézer 488 és 515 nm-es, a kriptonlézer 647, 568 és 531 nm-es, a He-Ne lézer 633 nm-es, diódalézerek 785, 840 és 472 nm-es, valamint a Nd:YAG lézer 1064 nm-es és az utóbbi fotonfrekvencia kétszeresített és háromszorozott, 532 és 355 nm-es sugárzását használják. A Raman-sávok intenzitása ( $I_i$ ) és relatív intenzitása is függ a besugárzó lézer hullámhosszától:

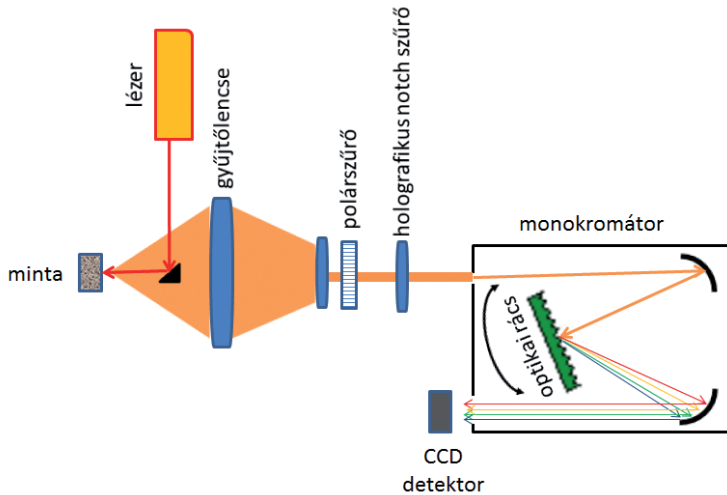
$$I_i = CI_0(\nu_0 - \nu_i)^4, \quad (8.12)$$

ahol  $C$  – többek között – a polarizálhatóságtól és az optikai elrendezéstől függő arányossági tényező,  $I_0$  és  $\nu_0$  a besugárzó lézertény intenzitása és frekvenciája,  $\nu_i$  pedig a vizsgált rezgési módus frekvenciája. Látható, hogy a Raman-szórás hatásfoka durván a lézertény frekvenciájának negyedik hatványával nő, így pusztán az intenzitást tekintve előnyösebb minél kisebb hullámhosszú lézert alkalmazni. A kis hullámhosszú látható, valamint UV-lézerek alkalmazása esetében viszont nagy az esélye annak, hogy a mintát (vagy a kis mennyiségben jelen levő szennyező molekulákat) elektronikusan gerjesztjük, amelyek fluoreszcenciával kerülhetnek vissza alapállapotba. Mivel a fluoreszcencia hatásfoka jóval nagyobb a Raman-szóráséhoz képest, ezért az elnyomhatja a Raman-spektrumot. Emiatt a spektrométereket több lézertel szerelik fel, és ilyen esetben előnyös nagy hullámhosszú, NIR-lézer (pl. 1064 nm) használata is. Hangolható lézer segítségével megoldható az, hogy olyan gerjesztéshez közeli hullámhosszt válasszunk (*rezonancia Raman-spektroszkópia*), amelynél a Raman-szórás hatásfoka nagy, de a fluoreszcencia nem jelentős.

A szórt fényt a mintáról többféle elrendezésben lehet összegyűjteni. Leggyakrabban a belépő lézer irányából (*180°-os geometria*), *hátraszórt* geometriát alkalmaznak, de lehetséges oldalról (*90°-os geometria*) és előlről (*0°-os, transzmissziós elrendezés*) is összegyűjteni a szórt fényt. Síkban polarizált besugárzó fény esetében (a lézersugárzás többnyire eleve ilyen) a szórt fényben a molekula és a rezgés szimmetriája határozza meg azt, hogy mennyi a beeső fényvel párhuzamosan és az arra merőlegesen síkban polarizált Raman-sugárzás hányada. Ezt a spektrumanalízishez segítséget nyújtó, ún. *depolarizációs Raman-hányadot* egyszerűen, a gyűjtőlencse után elhelyezett polárszűrő segítségével lehet mérni. Mivel a szórt fényben nagyságrendekkel nagyobb a Rayleigh-szórásból és a reflexióból származó besugárzó fénynek megfelelő hullámhosszú fény, mint a Raman-szórásból származó, a lézerténynél kisebb, illetve nagyobb hullámhosszú fény, ezért az előbbit a detektor telítésének elkerülése és a zaj csökkentése miatt ki kell szűrni. Ezt korábban monokromátor segítségével oldották meg, napjainkban pedig olyan ún. holografikus szűrőkkel (holographic notch filter) végzik, amelyek a lézertény hullámhosszának közelében csak mintegy néhány  $10\text{ cm}^{-1}$ -es tartományt vágnak ki a spektrumból.

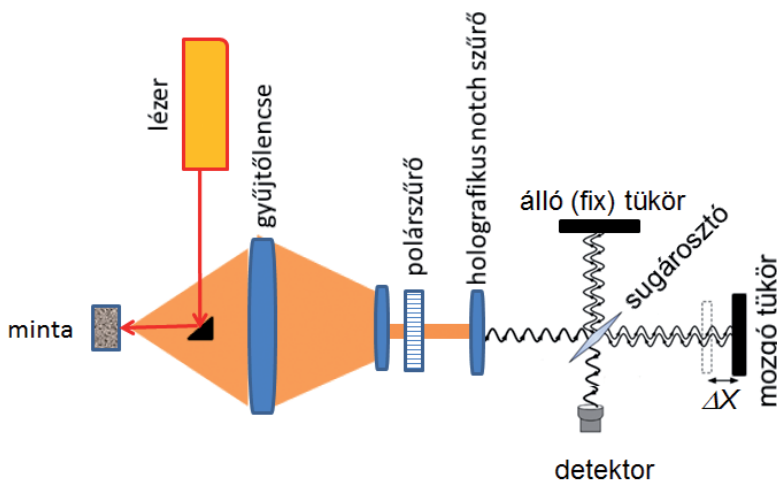
A szórt fény hullámhossz-szerinti felbontása az UV- és látható tartományban szinte kizárólag monokromátorokkal történik. Ezekben az ún. *diszperziós Raman-készülékekben* (8.15. ábra) a jobb felbontás érdekében gyakran alkalmaznak dupla, sőt tripla monokromátorokat. NIR-tartományban Fourier-transzformációs elven könnyebben lehet analizálni a szórt fényt, mint monokromátor segítségével. Ezeket a

*Fourier-transzformációs Raman-spektrométereket* (8.16. ábra) gyakran az FT-IR-készülékekkel építik egybe. Ennek a fő előnye az, hogy a sugárosttó cseréjével ugyanaz az interferométer használható Raman- és IR-mérésekhez.



8.15. ábra. Diszperziós Raman-készülék vázlatos rajza (visszaszórásos geometria)

Detektorként UV- és látható tartományban fotoelektron-sokszorozó csöveket (photomultiplier tube, PMT) lehet alkalmazni, de ezeket egyre inkább felváltják a CCD-kamerák.



8.16. ábra. Fourier-transzformációs Raman-készülék vázlatos rajza (visszaszórásos geometria)



Az utóbbiak, noha kevésbé érzékenyek, mint a fotoelektron-sokszorozó csövek, jelentősen felgyorsítják a mérést. Ekkor ugyanis a monokromátorról kilépő fényt hullámhossz szerint a CCD-detektor egyik tengelye mentén elhelyezkedő pixeleire képezik le, így akár a teljes spektrum mérése is egy időben végezhető el, míg fotoelektron-sokszorozó alkalmazásakor a mérés spektrumpontonként egymás után történik. A NIR-tartományban leginkább kriogén hűtésű félvezető detektorokat, pl. Ge-ot alkalmaznak.

#### **8.4.4. Raman-spektrumfelvételi technikák**

Folyadékminták Raman-mérése történhet kvarcküvetében, üvegcsőben (NMR-cső), vagy kevés minta esetében kapillárisban. Az utóbbi esetben speciálisan a kapillárisokhoz kialakított sferikus tükör segítségével érhető el, hogy a kevés Raman-szórt fényt nagyon hatékonyan összegyűjtsük. Különösen ultraibolya lézer alkalmazása és híg minták vizsgálata esetében ügyelni kell arra, hogy a mintatartó anyaga ne fluoreszkáljon. Száloptika segítségével a fény bevezethető reaktorba is, ahonnan szintén száloptikával vezethető vissza a spektrométerbe.

Nagyobb szilárd mintákat, pasztillákat közvetlenül mérhetünk visszaszórásos elrendezésben. Porokat fémkorongban (pl. alumíniumban) kialakított kis részbe préselve mérhetünk. Egyre gyakoribb a Raman-mikroszkóp alkalmazása is.

Paramágneses fémek, különösen az ezüst felületére felvitt anyagok esetében a Raman-szórás hatásfoka nagyságrendekkel megnőhet a tömbfázisban vagy oldatban észlelthez képest. Ezt használja ki az ún. *felületerősített Raman-szórás (SERS)* technika. Ezzel a módszerrel akár monomolekuláris rétegek is tanulmányozhatók.

### **8.5. Speciális módszerek**

Ebben a fejezetben a rezgési spektroszkópia számos speciális módszere közül csak azokat tárgyaljuk röviden, amelyeket a gyógyszerkutatásban és analitikában vagy már elterjedten alkalmaznak, vagy amelyek ezen a területen ígéretes jövő előtt állnak.



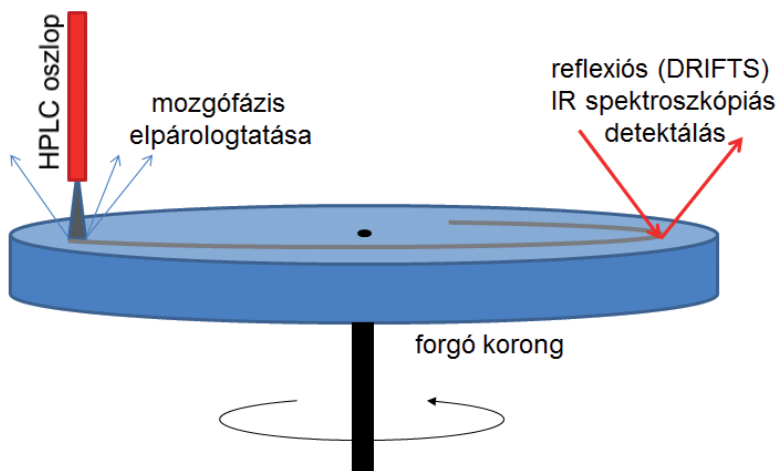
## 8.5.1. Csatolt technikák

Csatolt technikák alatt általában egy elválasztástechnikai és egy spektroszkópiai módszer kombinációját értjük.<sup>5</sup> Az együttes alkalmazás lehetővé teszi azt, hogy egy keverék minden egyes komponenséről külön-külön vehessünk fel spektrumot. Az IR-spektroszkópiát leggyakrabban termikus gravimetriával (TGA), gázkromatográfiával (GC), nagyhatékonyságú folyadékkromatográfiával (HPLC), szuperkritikus folyadékkromatográfiával (SFC) és vékonyréteg kromatográfiával (TLC) szokták csatolni. Az első négy módszer esetében speciális átfolyó küvetták alkalmazhatók, a minta közvetlenül a TGA kamrájának vagy a kromatográfiás oszlop elhagyása után („on-the-fly”) vizsgálható. A folyadékkromatográfiás módszereknél esetenként, a TLC esetében pedig mindig „off-line” módszert alkalmaznak, azaz az oszlopról lejövő folyadék kis mintáiból vagy a vékonyréteg különböző pontjairól vesznek mintát.

A GC-FTIR spektroszkópia esetében ún. „lightpipe”-ot alkalmaznak, amely a szokásos IR-küvettánál jóval kisebb, tipikusan pár tized mm átmérőjű és néhányszor 10 cm hosszú, a fényvesztés minimalizálása érdekében belülről arannyal bevont, átfolyó küvetta. Az injektált anyagmennyiség néhány  $\mu\text{l}$ , a detektálási határ néhányszor 10  $\mu\text{g}$ . A GC-FTIR spektroszkópiai módszer esetében a spektrumokat általában kis, 8–32  $\text{cm}^{-1}$  felbontással veszik fel. Különösen gyors mérések, előzetes próbák esetében szokás a mintát nem tartalmazó interferogramok és a minta interferogramja közötti eltérést egy skaláris számmal jellemezni (Gram–Schmidt-módszer). Ebben az esetben egy egyszerű kromatogramot kapunk, míg ha minden interferogram esetében elvégeztetjük a Fourier-transzformációt, akkor az idő függvényében IR-spektrumokat kapunk. Ez utóbbit *kemigram*nak is szokás nevezni. A spektrumokat akár mérés közben, akár utólagos kiértékelés során számítógépes algoritmussal össze lehet vetni egy digitális GC-FTIR adatbázis spektrumjaival, így akár spektrumanalízis nélkül is be lehet azonosítani a komponenseket. Esetenként alkalmaznak többszörösen csatolt vagy kettős detektálású módszereket is, ilyen például tömegspektrométerrel (MS) csatolt GC-FTIR-MS vagy a lángionizációs detektálással (flame ionisation detector, FID) kombinált ún. GC-FTIR-FID technika.

A HPLC- és az SFC-módszer esetében átfolyó küvettákon és az „off-line” detektáláson túl olyan speciális elrendezést is alkalmaznak, amelynél az oszlopról lejövő folyadék egy forgó korong felületére csöppen, a korong egy másik pontján pedig reflexiós IR- vagy Raman-spektrumot vesznek fel (8.17. ábra). Megfelelő méret, forgási sebesség, szükség esetén melegítés

segítségével érhető el, hogy az oldószer a spektroszkópiás mérési pont előtt teljesen elpárologjon.



8.17. ábra. A HPLC-IR csatolás egy lehetséges megvalósítása

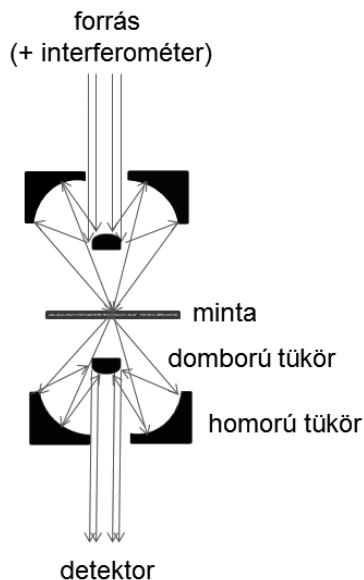
## 8.5.2. FT-IR- és Raman-mikroszkópok és képpalkotás

A rezgési spektroszkópiai módszerek alkalmasak a felület milliméternél kisebb pontjainak vizsgálatára is. A felület pontjainak kétdimenziós (2D) analízise két módszerrel történhet, *térképezéssel* és *képpalkotással* (*mapping* és *imaging*). Térképezésről akkor beszélünk, ha a felületen pontról pontra haladva egy megfelelően kialakított spektromikroszkóp segítségével pontonként felvesszük a spektrumot. Képpalkotás esetében a detektor egy-egy pixelét megfeleltetve a minta egy-egy pontjának, leképezzük a felületet egy – leggyakrabban kétdimenziós – detektorsorra. *Hiperspektrális képpalkotásról* beszélünk akkor, ha több (legalább 10) hullámhosszon alkotunk képeket. A detektorra jutó hullámhosszt változtatva, azaz időben egymás után mérve, a felületpontok teljes spektrumát is megkaphatjuk. Azaz a két eltérő módszerrel, a térképezéssel és a képpalkotással, ugyanahhoz az információhoz juthatunk. Ma már mind NIR-, mind MIR-, valamint Raman-térképezésre és -képpalkotásra is forgalmaznak a kereskedelemben műszereket.

A MIR-tartományban FT-IR-mikroszkópok terjedtek el térképezésre. A modern készülékekben a felület látható tartományú videó képének segítségével választhatjuk ki a számunkra érdekes pontokat vagy a feltérképezendő felületet. Az IR-sugárzást egy – csillagászati teleszkópos

megfigyelésekhez kifejlesztett – ún. *Cassegrain-optika* (8.18. ábra) fókuszálja a felület egy pontjára, és (reflexiós mérésnél) ugyanezzel vagy (transzmissziós elrendezésnél) egy másik ugyanilyen optika segítségével gyűjti össze. A mérés történhet transzmissziós és reflexiós módban is. Újabban elterjedőben van a transzreflexiós (transflection) mérési mód is, amikor egy IR-tartományban tükröződő hordozóra viszik fel a minta vékony réteget. (A fény ilyenkor tükröződés előtt és után is áthalad a mintán.) A felbontás függ az optikai elrendezéstől, de az elvileg elérhető (ún. diffrakciólimitált) felbontás nagyságrendileg megegyezik a fény hullámhosszával. Ebből következően a MIR-mikroszkópok felbontása hozzávetőleg 10  $\mu\text{m}$ . Mivel az elvi felbontás a minta és a külső közeg relatív törésmutatójától is függ, ezért nagy törésmutatójú (pl. Ge) segédkristályokkal, ATR-elrendezésben, növelhető a felbontás.

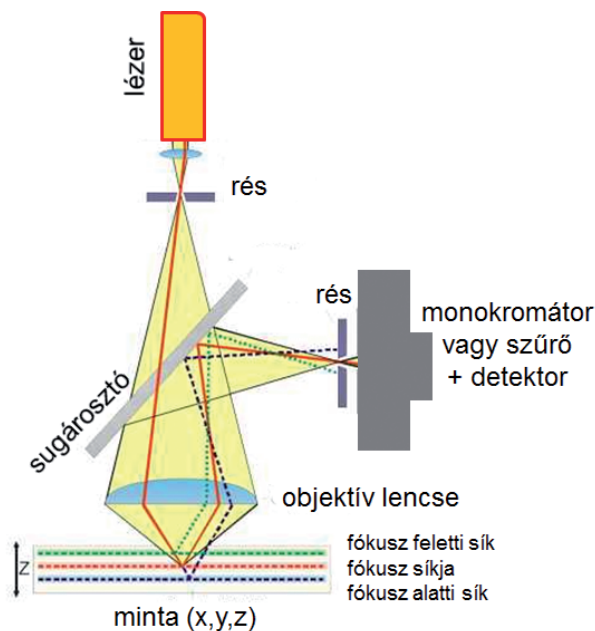
A rezgési spektroszkópiai térképező és képalkotó módszerek közül a hiperspektrális MIR-képalkotás a legfiatalabb, ezek a FT-IR-műszerek csak a XX. század utolsó néhány évében jelentek meg a piacon. A megvilágított felületről a képet leggyakrabban egy – a CCD-khez hasonló felépítésű – félvezető (MCT) detektorokból álló, ún. *fókuszsíktömb* (*focal plane array, FPA*)-detektorra képzik le. Ritkábban egydimenziós diódasor-detektorra képzik le a minta felületének egy sorát, és soronkénti képalkotással rakják össze a 2D képet.



8.18. ábra. Az IR-mikroszkópokban használt Cassegrain-optika (transzmissziós elrendezés)

NIR-térképezés és -képalkotás esetében is használhatnak FT spektrumfelbontást, de gyakoribbak a monokromátort tartalmazó diszperziós és a szűrős berendezések. A gyakrabban használt NIR-képalkotás esetében pl. az InSb vagy InGaAs FPA-detektorok elé hangolható folyadékkristály-szűrőket (liquid crystal tunable filter, LCTF), esetleg monokromátort építenek be. Ugyan a NIR-tartományban – a rövidebb hullámhossz miatt – elérhető elvi felbontás akár  $1\ \mu\text{m}$  alatti is lehet, a hiperspektrális NIR-képalkotásnál azonban mégsem törekszenek az elvi felbontás elérésére, inkább az érzékenységre optimalizálják a műszereket. A NIR-tartományban ugyanis nagyon gyengék az elnyelések, így transzmissziós elrendezésnél a megfelelő jel/zaj viszony eléréséhez akár több  $100\ \mu\text{m}$  vastagságú mintát kell vizsgálni. (Azaz ugyan a felületen  $\mu\text{m}$ -es felbontás érhető el, de a fény irányában több  $100\ \mu\text{m}$  hosszan átlagolódik ki a spektrum.) Porminták vagy tabletták reflexiós mérésénél pedig a NIR-sugárzás sokszoros, diffúz reflexiója csökkenti a felbontást, ami ebben az esetben néhány  $10\ \mu\text{m}$ -re tehető.

Az újabb, lézerekkel működő Raman-berendezések szinte minimális módosítással alakíthatók át mikroszkópokká, ezért nem meglepő, hogy ezeket nagyon hamar, már az 1970-es években kifejlesztették. A modern Raman-mikroszkópok a fluoreszcens mikroszkópokhoz kifejlesztett *konfokális (confocal) optikát* alkalmazzák (8.19. ábra).

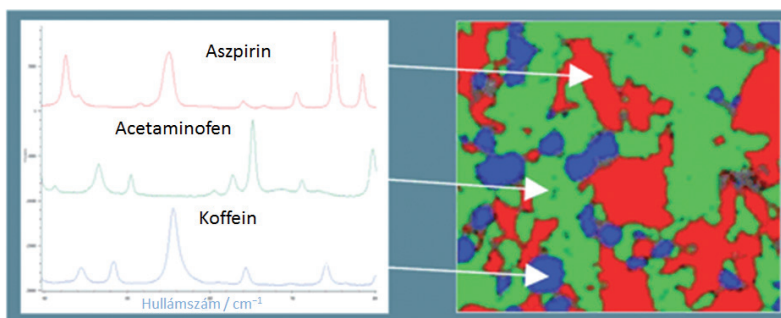


8.19. ábra. Konfokális Raman-mikroszkóp vázolata

A konfokális optikában a lézertény – a fókuszálhatóságot megszabó sugárprofil javításának érdekében – először egy szabályos kör alakú résen vezetik keresztül, majd a minta felületére fókuszálják. A Raman-szórt fényt ugyanazzal a fókuszáló lencsével gyűjtik össze, és egy sugárosztó tükör segítségével egy résen, majd a monokromátoron át, hullámhossz szerint képzik le a CCD-detektorra. A lézertény és a konfokális optikából adódó jó fókuszálhatóság lehetővé teszi, hogy érdekes felületű mintát is  $\mu\text{m}$ -es vagy akár az alatti felbontással fel lehessen térképezni. Sőt, a felület alatti pontra fókuszálva, limitált mértékben, kb. 10–25  $\mu\text{m}$ -ig, mélységi analízis is végezhető.

A hiperspektrális Raman-képalkotás esetében a lézertény defókuszálva egy nagyobb felületdarabot világítanak be. A Raman-térképezéssel ellentétben ekkor a minta felületi pontjait egy adott hullámhosszon képzik le a CCD pixeleire. A hullámhossz-szelekcióhoz a hiperspektrális NIR-képalkotáshoz hasonlóan LCTF vagy hangolható akusztóoptikus szűrőt (acusto-optic tunable filter, AOTF) használnak, de a NIR-képalkotó műszerekkel ellentétben a szűrő a minta és a detektor közé kerül.

Példaként (8.20. ábra) egy aszpirin, acetaminofen és koffein hatóanyagokat tartalmazó tablettá Raman-mikroszkópos képét és a képen jól elkülönülő három anyag egy-egy pontjáról készült spektrumot mutatjuk be. Az IR- és Raman-mikroszkópok és a képalkotás technikai részleteiről és felhasználási területeiről részletesen olvashatunk a [9] referenciában.

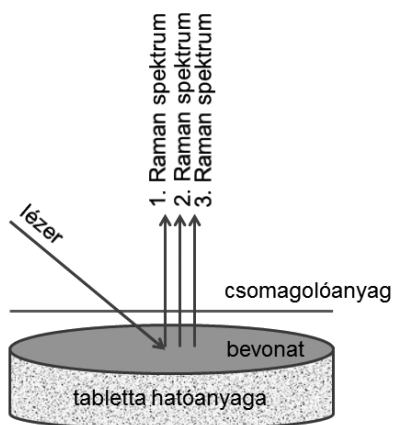


8.20. ábra. Egy háromkomponensű gyógyszerről készült Raman-kémiai kép, valamint az egyes komponensekről felvett Raman-spektrum

### 8.5.3. Térben elcsúsztatott Raman-spektroszkópia (SORS)

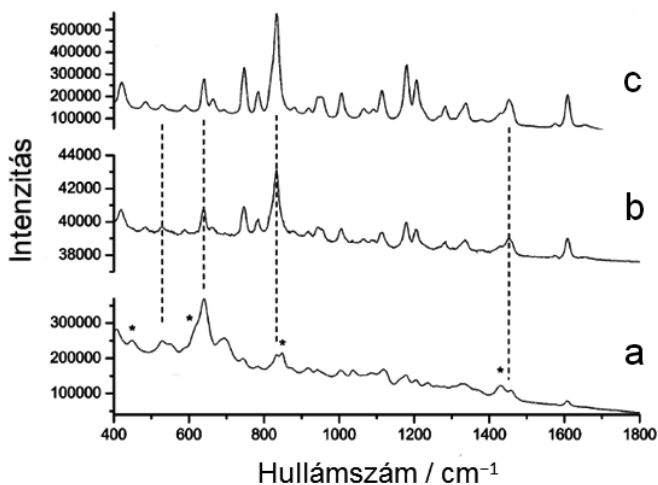
A térben elcsúsztatott Raman-spektroszkópiát (*Spatially Offset Raman Spectroscopy, SORS*) többretegű anyagok roncsolásmentes vizsgálatára

fejlesztették ki 2005-ben.<sup>10</sup> A módszer lényege az, hogy a szórt fényt a lézerrel megvilágított ponthoz képest két vagy több, térben eltérő helyről gyűjtik össze (8.21. ábra).



8.21. ábra. A SORS-mérés elve. A többféle pozícióban felvett Raman-spektrumok megfelelő (automatizált) kivonásával megkapható az egyes rétegek, így például a hatóanyag spektruma

A megvilágított pontból összegyűjtött szórt fényben főleg a külső réteg Raman-sávjai dominálnak, míg a megvilágítástól távolabbi (néhány mm-re lévő) pontból összegyűjtött szórt fényben relatíve intenzívebben jelennek meg a mélyebben elhelyezkedő anyag Raman-sávjai.



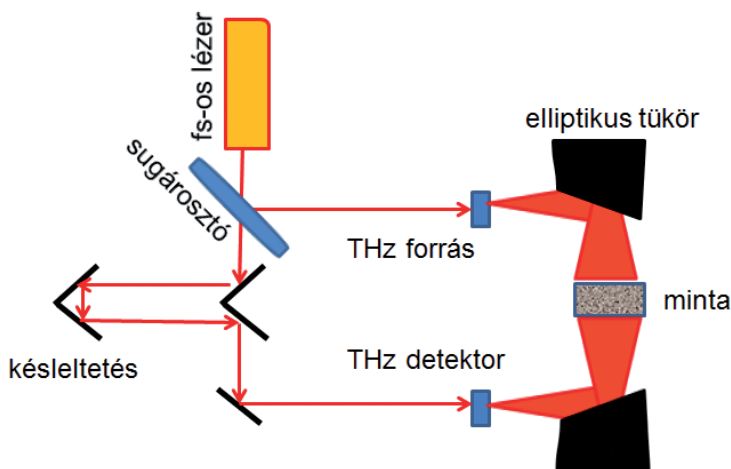
8.22. ábra. Egy Nurofen-kapszuláról felvett konvencionális Raman-spektrum (a), a kapszuláról felvett SORS-spektrum (b), valamint a hatóanyagról felvett Raman-spektrum (c); 11. ref.-ből átrajzolva

A spektrumok megfelelően (automatizált) skálázott kivonásával eliminálható a külső réteg spektruma. Több vékonyréteg esetén akár az egyes rétegek spektruma is megkapható. A módszer többek között kiválóan alkalmas vékonybevonattal ellátott tabletták vagy műanyagba, papírba csomagolt, sőt, akár színezett üvegedényben tárolt porok és tabletták csomagolás alatti vizsgálatára. A 8.22. ábrán példaképpen kapszulába csomagolt Nurofen Raman- és SORS-spektruma, illetve összehasonlításként a csomagolatlan Nurofen Raman-spektruma látható. További példák találhatóak a [11,12] referenciákban.

### 8.5.4. Távoli IR- és terahertz-spektroszkópia, 3D terahertz-képképzés

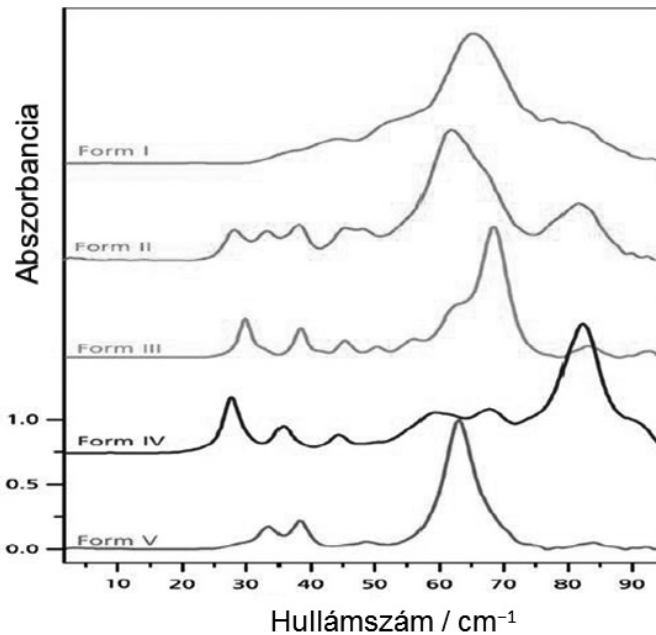
A FIR-tartományban megjelenő intermolekuláris rezgések és rácsrezgések a gyógyszerkutatásban a polimorf módosulatok azonosítása miatt bírnak nagy jelentőséggel. A hagyományos IR-technikákkal a FIR-tartomány kisenergiájú felének detektálása azonban nehézkes, nagyon érzékeny és költséges detektorokra (kriogén hűtésű bolométre) van szükség. Hagományos FT-IR- és diszperziós IR-technikával ezért a kb.  $150\text{ cm}^{-1}$ -nél nagyobb energiájú tartomány vizsgálható rutinszerűen.

Az ezredfordulótól egy új, elvileg különböző mérési elven alapuló módszer indult gyors fejlődésnek, az úgynevezett *impulzusos terahertz-spektroszkópia* (TPS, *terahertz pulsed spectroscopy*) és *-képképzés* (TPI, *terahertz pulsed imaging*).<sup>13–15</sup> A TPS- (8.23. ábra) és TPI-módszereknél THz-es fénynyalábot leggyakrabban úgy hoznak létre,



8.23. ábra. Impulzusos terahertz-spektrométer (TPS) vázlatos rajza

hogy egy Ti-zafir lézer NIR-tartományába eső, ultrarövid (fs-os nagyságrendű) fényimpulzusával sugároznak be egy fényelektromos kapcsolót (pl. GaAs félvezetőt). A koherens fénynyalábot egy sugárosztóval kettéosztják. Az egyik rövid THz-es fényimpulzust vagy keresztülvezetik a mintán, vagy a mintáról visszavert sugárzást gyűjtik össze és fókuszálják egy detektorra, ami ugyancsak egy fényelektromos kapcsoló. A másik nyalábot egy változtatható időzítésű optikai késleltetőn vezetik keresztül, majd ugyanarra a detektorra fókuszálják, így ott szuperponálódik az első fénynyalábbal. Az abszorpciós spektrum – a törésmutató spektrumával együtt – a késleltetési idő függvényében mért jel Fourier-transzformációjával kapható meg.



8.24. ábra. A szulfatiazol öt polimorf módosulatának terahertz-spektruma<sup>15</sup>

A TPS-módszerrel jelenleg  $1 \text{ cm}^{-1}$  felbontású spektrum kevesebb, mint 1 perc alatt felvehető. A detektálási határ – anyagtól függően – akár femtomoláris vagy keverékeknél ppt ( $10^{-12}$ ) mennyiségű is lehet. A THz-spektrumok rendkívül érzékenyek a polimorf módosulatra. Példaként a szulfatiazol öt polimorf módosulata látható a 8.24. ábrán. Kiválóan alkalmas a módszer a polimorf átalakulások követésére is. Mivel az amorf anyagok szinte teljesen átteresztenek a THz-tartományban, ezért papírba, ruhába csomagolt anyagok is mérhetők. Ennek a minőség-ellenőrzésben és a biztonságtechnikában nagy jelentősége van; a TPS reptéri biztonsági



kapuk építésére, borítékban feladott kábítószerek, robbanóanyagok gyors azonosítására is alkalmas.

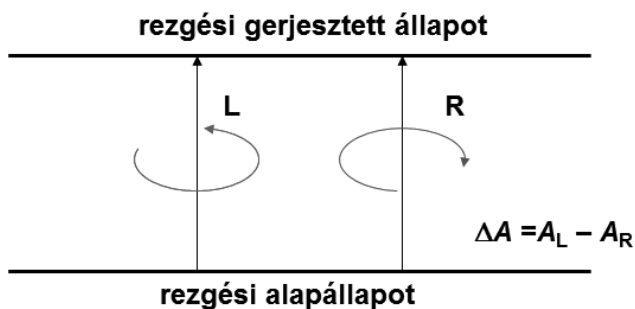
Az elsősorban felületi 2D információt nyújtó FT-IR- és Raman-mikroszkópiával és -képalkotással szemben a TPI lehetőséget ad 3D képalkotásra. Továbbá, a gyógyszer-analitikában alkalmazott 3D képalkotási, pl. ultrahangos módszerekkel szemben pedig spektrális, azaz kémiai információt is ad a TPI. Ráadásul, ahogy arról már szó volt, a spektrumok – a MIR-spektrumokkal szemben – érzékenyek a különböző polimorf módosulatokra. Ezekből következik, hogy a TPI kiválóan alkalmazható tabletták roncsolásmentes 3D letérképezésére, homogenitásvizsgálatokra, tablettabevonatok vastagságának és uniformitásának meghatározására. Újabban tabletták oldódási kinetikájának vizsgálatára is alkalmazzák. A TPI-módszer térbeli felbontása a besugárzó fényre merőlegesen (azaz a felületi felbontása) a hullámhossztól függően 50 és 700  $\mu\text{m}$  között van. A fény irányában a fényimpulzus hosszától függ a (mélységi) felbontás, 200 fs-os pulzusok esetében  $\sim 30 \mu\text{m}$ . Egy tablettáról 10–20 perc alatt 200  $\mu\text{m}$  térbeli és  $5 \text{ cm}^{-1}$  spektrális felbontású 3D THz-es kép alkotható.

### 8.5.5. Rezgési optikai aktivitás: VCD és ROA

Az optikai aktivitással kapcsolatos módszerek a királis molekulák és a síkban vagy cirkulárisan poláris (királis) fény kölcsönhatásának hullámhosszfüggését vizsgálják. Az így nyert spektrális információ segítségével megállapítható a vizsgált királis molekula abszolút konfigurációja. A *rezgési optikai aktivitás (vibrational optical activity, VOA)* családjába két gyakorlatban használt módszer, a *rezgési cirkuláris dikroizmus (vibrational circular dichroism, VCD)* és a *Raman optikai aktivitás (Raman optical activity, ROA)* tartozik. Mindkét technika viszonylag fiatal. Ugyan az első VCD- és ROA-méréseket már az 1970-es években elvégezték, a technikai fejlődés csak jóval később tette lehetővé rutinszerű alkalmazásukat. Az első VCD- és ROA-készülékeket 1997-ben, illetve 2003-ban hozták kereskedelmi forgalomba.

A síkban polarizált fény és a királis molekula kölcsönhatásakor az optikailag aktív molekula elforgatja az elektromágneses tér síkját. A hullámhossz függvényében mért forgatást *optikai rotációs diszperciónak (ORD)* nevezzük. A cirkulárisan polarizált fény esetében a jobbra és balra cirkulárisan polarizált fény eltérő abszorpcióját figyelhetjük meg. A fény hullámhosszának függvényében mért abszorpciókülönbséget (egységnyi

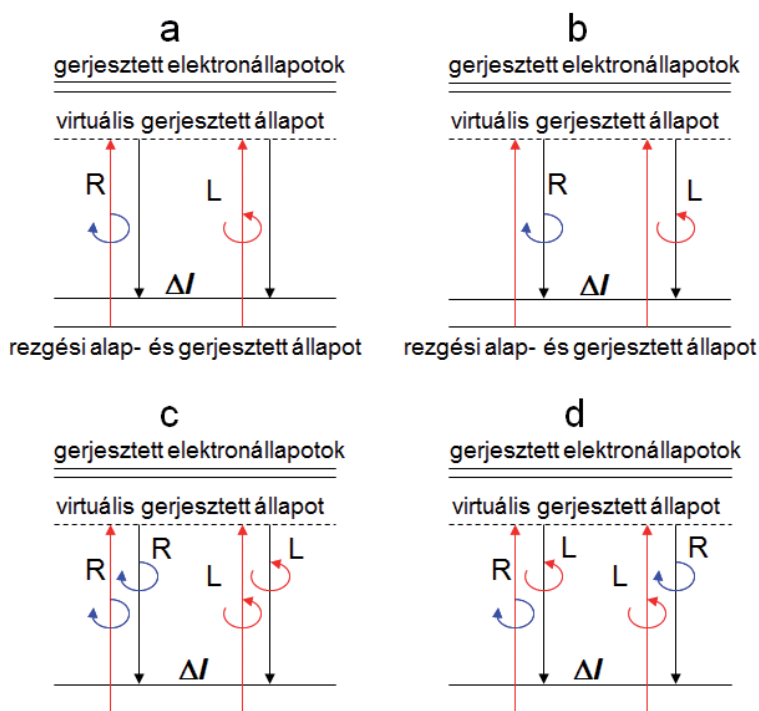
koncentráció és úthossz esetében ez a rotátorerősség) *cirkuláris dikroizmus (CD)* spektrumnak nevezzük. Ennek megfelelően a CD-spektrumokban olyan hullámhossznál találunk pozitív vagy negatív sávot, ahol a sávok az abszorpciók (például UV-látható vagy IR-) spektrumban is jelentkeznek. Az UV-látható tartományban a kétféle cirkulárisan polarizált fény között mérhető abszorpciókülönbség nagyságrendileg ezred, az IR-tartományban pedig tízezred–százezred része az abszorpciónak. Az enantiomerek CD-spektrumai a hullámhossz tengelyre tükörszimmetrikusak. Az UV-látható fény tartományában általában elektrongerjesztést vált ki a fény, ezért az ebben a tartományban felvett CD-spektrumokat gyakran *elektronikus CD (ECD)*-spektrumnak is lehet tekinteni. Hasonlóan, az infravörös fény tartományában rezgési (vibrational) CD (VCD)-spektroszkópiáról beszélünk. Az IR- és VCD-spektroszkópia tehát ugyanolyan viszonyban áll egymással, mint az UV-Vis és CD-spektroszkópia, csak a vizsgálati tartomány eltérő. A VCD-módszer elvét a 8.25. ábra mutatja.



8.25. ábra. A VCD-spektroszkópia elve

Raman optikai aktivitás (ROA) kísérletet többféleképpen is elvégezhetünk. Elvileg legegyszerűbb módszer, ha a besugárzó lézert fény cirkulárisan poláris. Ha a kétféle cirkulárisan polarizált fényvel besugárzott királis mintáról szóródó polarizálatlan fény intenzitáskülönbségét mérjük a hullámhossz függvényében, akkor az *ICP-ROA* (Incident Circular Polarization ROA)-spektrumhoz jutunk. Ha a besugárzó fény polarizálatlan, és a szórt fényben vizsgáljuk meg a kétféle cirkulárisan polarizált fény intenzitásának a különbségét a hullámhossz függvényében, akkor *SCP-ROA* (Scattered Circular Polarization ROA)-spektrumot kapunk. Végezhetünk olyan kísérletet is, amelyben a besugárzó fény is cirkulárisan poláris és a szórt fényben is a kétféle cirkulárisan polarizált fény intenzitáskülönbségét vizsgáljuk. Ez a kétszeresen (dual) cirkulárisan polarizált módszer, a *DCP-ROA*. A  $DCP_1$ -ROA esetében a jobbra cirkulárisan polarizált fényvel besugárzott mintáról szóródó jobbra cirkulárisan polarizált fény

intenzitásából vonjuk ki a balra cirkulárisan polarizált fényel besugárzott mintáról szóródó balra cirkulárisan polarizált fény intenzitását. A DCP<sub>II</sub>-ROA esetében pedig a jobbra cirkulárisan polarizált fényel besugárzott mintáról szóródó balra cirkulárisan polarizált fény intenzitásából vonjuk ki a balra cirkulárisan polarizált fényel besugárzott mintáról szóródó jobbra cirkulárisan polarizált fény intenzitását. A négyféle ROA-alapmérést tekinti át a 8.26. ábra.



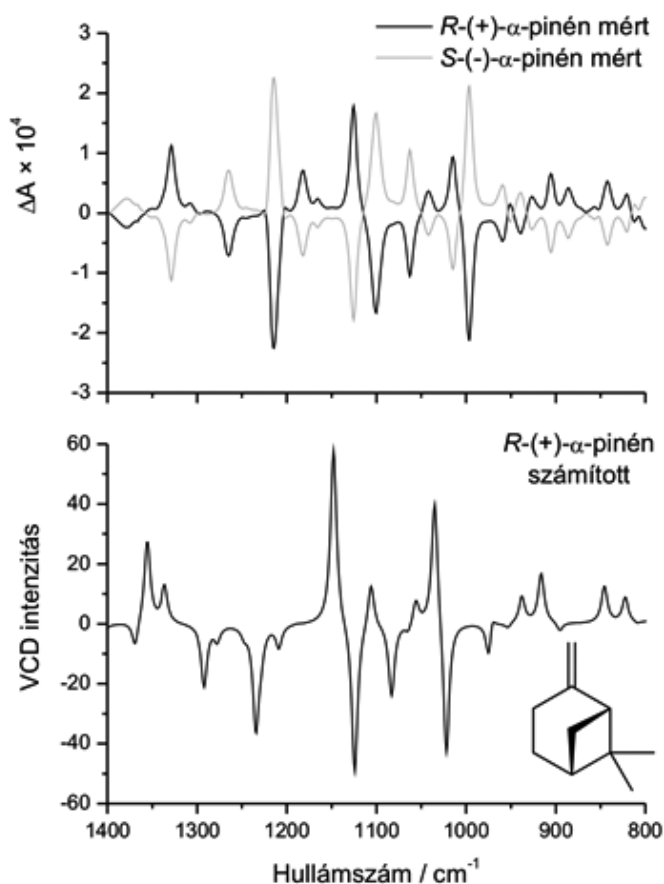
8.26. ábra. A ROA-spektroszkópiai módszerek elve: ICP-ROA (a), SCP-ROA (b), DCP<sub>I</sub>-ROA (c), DCP<sub>II</sub>-ROA (d)

A négyféle ROA-spektrum elvileg nem egyenértékű, de a gyakorlatban az ICP-ROA-, az SCP-ROA- és a DCP<sub>I</sub>-ROA-spektrumok között kis eltérés mutatkozik. További variációt jelent az is, ha az SCP-ROA esetében a beeső, vagy ha az ICP-ROA esetében a vizsgált szórt fény nem polarizálatlan, hanem lineárisan polarizált. Szintén elvileg is különböző spektrumokhoz jutunk, ha a besugárzó és a szórt fény közötti szögét változtatjuk. A gyakorlatban leginkább az SCP-ROA-módszert és „hátraszórt” geometriát (a besugárzó és a szórt fény 180°-os szögét zár be) használják. Így működik az egyetlen kereskedelemben kapható készülék is.

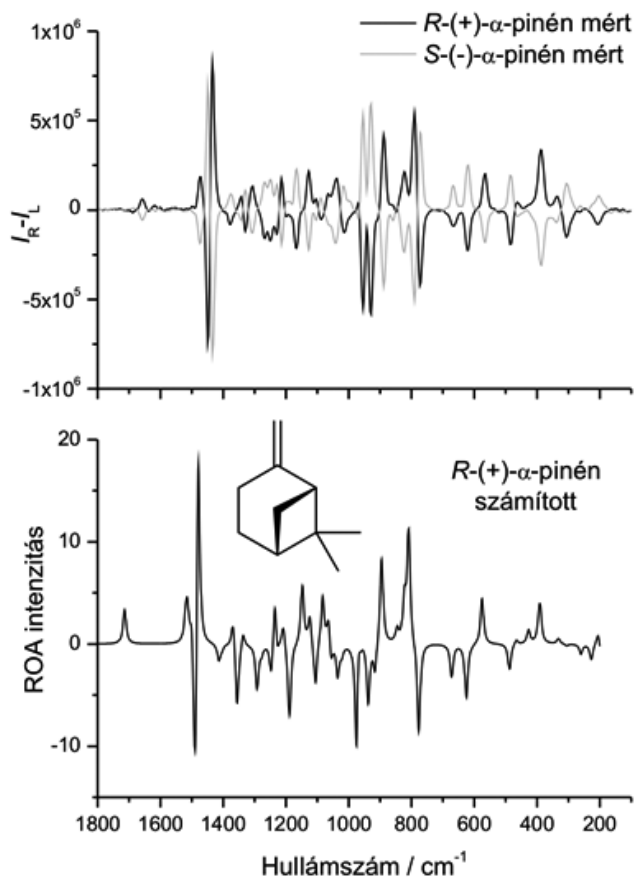
Kijelenthető, hogy a VCD- és a ROA-spektroszkópiák ma már az egyik leghatékonyabb, legmegbízhatóbb és leggyorsabb módszerei az abszolút konfiguráció meghatározásának. A gyógyszerkémiaiában legelterjedtebben használt módszer az abszolút konfiguráció meghatározására az egykristály-röntgendiffrakció, amely az atomok anomális diszperziójának mérésén alapul. Az érzékeny detektorok megjelenése tette lehetővé mintegy negyven évvel ezelőtt, hogy anomálisan szóró centrum jelenléte esetén a visszaszórt sugár diszperzióját mérni tudjuk. A diffrakciós abszolút konfiguráció meghatározás elvégzésének feltétele, hogy egykristályt kell növesztetni (a kristályosítás egyben hatékony tisztítási eljárás is), valamint hogy a molekulának legalább két-három oxigénatomot vagy oxigénnél magasabb rendszámú atomot kell tartalmaznia. A VOA-módszerek sokkal rövidebb minta-előkészítést igényelnek. A diffrakciós vizsgálathoz tiszta anyagokra, sőt, enantiomertiszta anyagra van szükség. Ezzel szemben VCD- és ROA-mérések esetében a mintának nem kell enantiomertisztnak lennie, mintegy 10%-os enantiomerfelesleg is elég a meghatározáshoz. A VCD- és ROA-spektrumok felvétele valamivel, de nem jelentősen több időt igényel, mint egy ECD-spektrum felvétele. Ugyanakkor az ECD-vel szemben nincs szükség kromofórcsoportra és kémiai átalakításra sem. Ez egyrészt annak köszönhető, hogy a spektrumértékeléshez kvantumkémiai módszerekkel számított VCD- és ROA-spektrumok jóval megbízhatóbbak, mint a számított ECD-spektrumok, mivel nincs szükség gerjesztett állapotok tulajdonságainak számítására. Másrészt mind a VCD-, mind a ROA-spektrumok sokkal részletgazdagabbak, mint az ECD-spektrumok. A közepes és kis molekulák esetében is egy, vagy akár több tucat sávra is lehet alapozni a konfiguráció meghatározását, azaz egy-egy bizonytalan, számítások alapján rossz előjellel jelzett sáv nem befolyásolja számottevően az asszignáció megbízhatóságát. A VCD-spektrumok értelmezésének megbízhatóságát az is növeli, hogy a számított előjelek és intenzitások mellett az egyes sávokhoz megbízhatósági faktort kapunk a számításokból. A VCD-vel történt abszolút konfiguráció meghatározásokat ma már az amerikai gyógyszergyártást felügyelő szervezet, az FDA (Food and Drug Administration) hivatalosan is elismeri. A nagyobb gyógyszergyárak között például a GlaxoSmithKline, a Bristol-Myers Squibb Co., a Wyeth/Pfizer, az Eli Lilly, és az AstraZeneca már kb. tíz éve rutinszerűen használja a VCD-technikát.

Mind a VCD-, mind a ROA-spektrumok effektív és megbízható számítása ma már számos programcsomagba, így a legelterjedtebben használt Gaussian csomagba is, be van építve. A közepes méretű merev molekulák számítására ezt a programcsomagot „feketedoboz”-szerűen is

alkalmazhatjuk. Egy-egy példát mutat be a számított és mért VCD- és ROA-spektrumokra a 8.27. és a 8.28. ábra. Nagyobb tapasztalatot, körültekintést igényel a flexibilis molekulák abszolút konfigurációjának meghatározása. Mivel a VCD- és ROA-spektrumok érzékenyebbek a konformációra, mint az ECD-spektrumok, ezért multikonformációs molekulák esetében az abszolút konfiguráció meghatározása a konformációs eloszlás egyidejű meghatározásával lehetséges. A konformációval szembeni érzékenységük miatt a VOA-módszereket az abszolút konfiguráció meghatározásán kívül – ismert vagy ismeretlen abszolút konfigurációjú vegyületek – konformációanalízisére is széleskörűen használják. Mivel a ROA esetében leggyakrabban használt oldószer a víz, ezért ez a módszer kiválóan alkalmas biomolekulák natív környezetben felvett térszerkezetének tanulmányozására is.



8.27. ábra. Az *R*-(+)- $\alpha$ -pinén és az *S*-(-)- $\alpha$ -pinén mért (hígítatlan minta) és az *R*-(+)- $\alpha$ -pinén számított (B3LYP/aug-cc-pVTZ, oldószermodell nélkül) VCD-spektruma



8.28. ábra. Az  $R(+)$ - $\alpha$ -pinén és az  $S(-)$ - $\alpha$ -pinén mért (532 nm lézerhullámhossz, hígítatlan minta) és az  $R(+)$ - $\alpha$ -pinén számított (B3LYP/aug-cc-pVTZ, oldószermodell nélkül) SCP-ROA-spektruma

A VOA-módszerekről egy részletesebb magyar nyelvű áttekintő közlemény mellett<sup>16</sup> számos, a műszerekkel, az elmélettel, vagy az alkalmazásokkal foglalkozó könyv és összefoglaló cikk is megjelent.<sup>17-21</sup>

### 8.5.6. Nemlineáris Raman-módszerek

*Nemlineáris Raman-szóródásról* akkor beszélünk, ha egy időben több foton szóródik a molekuláról.<sup>2,5</sup> Ezt a jelenséget csak nagyon intenzív besugárzást használva figyelhetjük meg, ami nagy teljesítményű lézerekkel állítható elő. Az elvileg legegyszerűbb eset az ún. *hiper-Rayleigh-* és a *hiper-Raman-szóródás*. A hiper-Rayleigh-szóródás esetében a molekulán

egy időben szóródó két foton energiája összeadódik, a kölcsönhatás eredményeképpen egy, a beeső fotonok frekvenciájához ( $\nu_0$ ) viszonyítva kétszer akkora frekvenciájú ( $2\nu_0$ ) foton jelenik meg. A hiper-Raman-szóródáskor a  $2\nu_0 - \nu_i$  (Stokes) és a  $2\nu_0 + \nu_i$  (anti-Stokes) fotonok jelennek meg, ahol  $\nu_i$  a molekula hiper-Raman-aktív rezgési módusainak frekvenciáját jelöli. A hiper-Raman-spektroszkópia nagy előnye, hogy a besugárzó fény és a hiper-Raman-szórt fény hullámhossza jelentősen eltér, így a háttérzaj jóval kisebb. Mivel a kiválasztási szabályok is eltérnek a Raman- és az IR-spektroszkópia kiválasztási szabályaitól, így e két technikához képest kiegészítő információval bír.

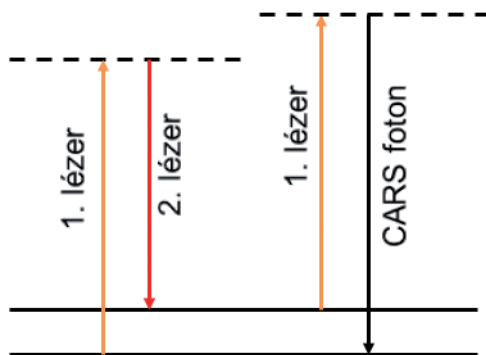
A nemlineáris technikák közül az ún. *koherens anti-Stokes Raman-szóródás (CARS)* tűnik a legígéretesebb módszernek. Ebben az esetben három foton szóródik a molekulán. Az első két foton frekvenciáját úgy választják meg ( $\nu_1$  és  $\nu_2$ ), hogy a foton frekvenciák különbsége megegyezzen a molekula egy rezgési gerjesztésének frekvenciájával ( $\nu_i$ ):

$$\nu_i = \nu_1 - \nu_2 \quad (8.13)$$

Ha csak ez a két foton hat kölcsön a molekulával, akkor ún. *kényszerített Raman-szórás (stimulated Raman scattering, SRS)* által gerjesztődhet a molekula. A CARS esetében ezzel egy időben az egyik besugárzó lézer egy további,  $\nu_1$  frekvenciájú fotonja is szóródik a molekulán, miközben egy negyedik, anti-Stokes-foton ( $\nu_{AS}$ ) hagyja el a molekulát (8.29. ábra). A kölcsönhatás eredményeképpen a molekula az eredeti állapotban marad, azaz

$$\nu_{AS} = 2\nu_1 - \nu_2. \quad (8.14)$$

Mivel a pillanatszerű (koherens) szórás során a fotonoknak ki kell elégíteni az impulzusmegmaradást, ezért a besugárzó két lézer iránya megszabja a kilépő anti-Stokes-fotonok irányát. Ez rendkívül nagy előnyt biztosít



8.29. ábra. A CARS-spektroszkópia elve

a detektáláshoz, ugyanis nem kell összegyűjteni nagy térszögből a kilépő fotonokat; a detektort elég egy, a besugárzó lézerek által kijelölt irányban elhelyezni. Ezzel szemben a fluoreszcens fotonok a tér minden irányába azonos valószínűséggel hagyják el a molekulát, így a detektorra csak ezek elhanyagolható része jut el, következésképpen nagyon kicsi a háttérzaj. További előny az is, hogy az effektus a besugárzó két fénynyaláb kis metszéspontjában jön csak létre, ami lehetővé teszi felületek 2D, vagy folyadékok (akár biológiai minták, pl. sejtek) 3D vizsgálatát, feltérképezését is.

A komolyabb technikai háttér miatt mind az itt bemutatott, mind az egyéb nemlineáris Raman-módszerek nem a rutin gyógyszer-analitikában, csak a gyógyszerkutatáshoz kapcsolódó alap kutatásokban használatosak.

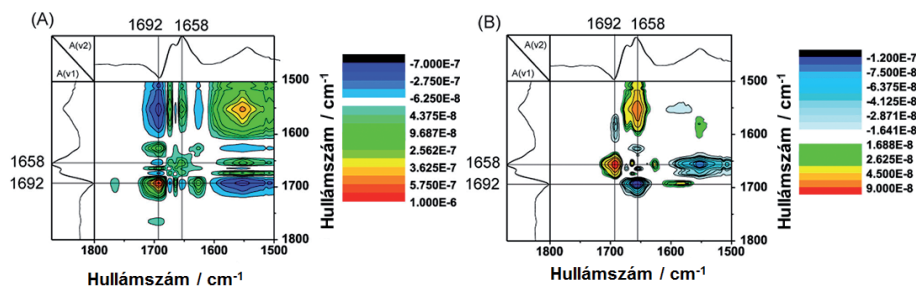
### 8.5.7. 2D korrelációs spektroszkópia

A félreértések elkerülése miatt fontos már e fejezet elején megjegyezni, hogy a *2D korrelációs spektroszkópia* nem térbeli felbontást jelent, hanem a 2D NMR-spektrumokhoz hasonlóan mindkét tengelyen energia, azaz ebben az esetben hullámhosszskála van. A 2D IR-spektroszkópia eredeti ötlete a 2D NMR-ből származik (lásd részletesen a 10. fejezetben), azaz különböző frekvenciákon történő impulzusszerű besugárzás és ezután a mintáról az idő függvényében felvett spektrumokból megállapíthatók a különböző átmenetek közötti kölcsönhatások, csatolások. Az optikai spektroszkópiában ez a módszer ugyan kivitelezhető, de az alkalmazott technika bonyolultsága (pl. femtoszekundumos lézerek) miatt csak az alap kutatásban jelent meg. Jóval szélesebb körben elterjedt azonban a Noda által kidolgozott, *általánosított 2D korrelációs spektroszkópia*.<sup>22-26</sup> Ennél a technikánál a spektrumokat nem ultrarövid besugárzás után az idő függvényében mérik, hanem valamilyen külső paraméter, például pH, hőmérséklet, koncentráció, reakció előrehaladása függvényében. Az eredeti 2D korrelációs rezgési spektroszkópiával szemben az általánosított 2D rezgési spektroszkópia nem a különböző rezgési módok közötti csatolás feltérképezésére, hanem többkomponensű rendszerekben a komponensek (beleértve az egyedi konformereket is) azonosítására, valamint sorozatos reakció szekvenciasorrendjének meghatározására szolgál.

A külső paraméter változásának függvényében felvett spektrumok korrelációanalíziséből egy szinkron és egy aszinkron spektrum nyerhető (8.30. ábra). (Az analízis matematikai hátterét lásd a [22–26] referenciákban.) A *szinkron spektrumok* szimmetrikusak a diagonálisra. A



diagonálisban maga a spektrum jelenik meg (autokorrelációs jelek). Az off-diagonálisban olyan két sáv között láthatunk pozitív jelet, amelyek együtt változnak, azaz együtt csökkennek vagy együtt nőnek a külső hatás függvényében. (Például a reaktánsok saját sávjai vagy a termékek saját sávjai közötti jelek.) Negatív a jel akkor, ha a változás ellentétes, azaz az egyik sáv nő, míg a másik sáv csökken. (Például reaktáns és termék jelei.) Az off-diagonális sávok intenzitása arányos a korreláció mértékével. Az *aszinkron spektrumok* off-diagonálisában akkor látunk jelet, ha a két sáv egymáshoz képest eltolódva követi a külső hatást (pl. reakció-intermedier egy sávja és a termék egy sávja közötti korreláció). Ennek megfelelően az aszinkron spektrumok diagonálisán nem láthatunk jeleket, és a spektrum antiszimmetrikus a diagonálisra, azaz tükrözésre változik az off-diagonális sávok előjele.



8.30. ábra. Felületen megkötött citokróom-C IR-spektrumaiból számított 2D korrelációs spektrumok: szinkron spektrum (a) és aszinkron spektrum (b). Az IR-spektrumokat a felület elektromos potenciáljának függvényében vették fel (részleteket lásd az 27. közleményben)

Az általánosított 2D korrelációs spektroszkópia nemcsak IR-, hanem egyéb, például Raman-, VCD-, UV-Vis és fluoreszcenciaspektrumok analizésére is kiválóan alkalmas. A spektrumokat kiértékelő, a szimmetrikus és antiszimmetrikus korrelációs spektrumokat kiszámító és megjelenítő algoritmusok ma már hozzáférhetőek a főbb mérőszoftverek részeként is.

## 8.6. Irodalom

1. Holly Sándor, Sohár Pál *Infravörös spektroszkópia*, Műszaki Könyvkiadó., **1968**.
2. Kovács István, Szőke József *Molekulaspektroszkópia*, Akadémiai Könyvkiadó, **1987**.
3. Ruff Ferenc *Szerves vegyületek szerkezetvizsgálata spektroszkópai módszerekkel: Infravörös Spektroszkópia*, Tankönyvkiadó, **1992**.
4. Harris, D. C.; Bertolucci, M. D. *Symmetry and Spectroscopy, An Introduction to Vibrational and Electronic Spectroscopy*, Oxford University Press:Dover, **1978**.
5. Schrader, B. *Infrared and Raman Spectroscopy, Methods and Applications*, Wiley-VCH, **1995**.
6. Griffiths, P.; De Haseth, J. A. *Fourier Transform Infrared Spectrometry (Chemical Analysis: A Series of Monographs on Analytical Chemistry and Its Applications)*, Wiley-Interscience, **2007**.
7. Larkin, P. *Infrared and Raman Spectroscopy; Principles and Spectral Interpretation*, Elsevier, **2011**.
8. Socrates, G. *Infrared and Raman Characteristic Group Frequencies: Tables and Charts*, Wiley, **2004**.
9. Salzer, R. Siesler, H. W. *Infrared and Raman Spectroscopic Imaging*, Wiley, **2009**.
10. Matousek, P.; Clark, I. P.; Draper, E. R.; Morris, M. D., Goodship, A. E.; Everall, N.; Towrie, M.; Finney, W. F.; Parker, A. W. *Appl. Spectrosc.* **2005**, 59, 393.
11. Eliasson, C.; Matousek, P. *Anal. Chem.* **2007**, 79, 1696.
12. Bloomfield, M.; Andrews, D.; Loeffen, P.; Tombling, C.; York, T.; Matousek, P. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2013**, 76, 65.
13. Taday, P. F. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. A* **2004**, 362, 351.
14. Zeitler, J. A.; Taday, P. F.; Newnham, D. A.; Pepper, M.; Gordon, K. C.; Rades, T. *J. Pharmacy and Pharmacology* **2007**, 59, 209.
15. Ingle, L. M. *Int. J. Pharmacy and Pharmaceutical Sci. Res.* **2013**, 3, 48.
16. Tarczay, G.; Vass, E.; Góbi, S.; Magyarfalvi, G. *Magy. Kém. Foly.* **2013**, 119, 53.
17. Nafie, L. A. *Vibrational Optical Activity: Principles and Applications*, John Wiley & Sons, **2011**.
18. Barron, L. D. *Molecular Light Scattering and Optical Activity*, Cambridge University Press, **2004**.
19. Stephens, P. J.; Devlin, F. J.; Cheeseman, J. R. *VCD Spectroscopy for Organic Chemists*, CRC Press, **2012**.
20. Yang, G., Xu, Y. *Top. Curr. Chem.* **2011**, 298, 189.
21. Magyarfalvi, G.; Tarczay, G.; Vass, E. *Wiley Interdiscipl.Rev.: Comp. Mol. Sci.* **2011**, 1, 403.
22. Noda, I. *Vibr. Spectrosc.* **2004**, 36, 143.
23. Noda, I. *J. Mol. Struct.* **2006**, 799, 2.
24. Noda, I. *J. Mol. Struct.* **2008**, 883–884, 2.
25. Noda, I. *J. Mol. Struct.* **2010**, 974, 3.
26. Noda, I.; Ozaki, Y. *Two-Dimensional Correlation Spectroscopy: Applications in Vibrational and Optical Spectroscopy*, Wiley, **2002**.
27. Zou, C.; Larisika, M.; Nagy, G.; Srajer, J.; Oostenbrink, C.; Chen, X.; Knoll, W.; Liedberg, B.; Nowak, C. *J. Phys. Chem. B* **2013**, 117, 9606.

## 9. Közeli infravörös (NIR) spektroszkópia

*Salgó András, Gergely Szilveszter*

### 9.1. Bevezetés

Az utóbbi évtizedben a *közeli infravörös* (NIR = near-infrared) módszerek gyors térhódítása következett be, aminek eredményeképpen ezen technika gyakorlati jelentősége a közép infravörös (MIR = mid-infrared) és a Raman-módszerek mellett erőteljesen megnövekedett. Ez elsősorban annak köszönhető, hogy a száloptikával működő, in-line, on-line eszközök (szondák) és a kemometria értékkelő módszerek fejlesztése lehetővé tették a hatékony ipari alkalmazásokat a minőség-ellenőrzésben és a folyamatmonitorozásban. A NIR-módszerek térhódításának másik oka, hogy a NIR-színképek elemzésére – ami a szélesebb frekvenciaintervallum és a sávok átlapolása miatt bonyolultabb, mint az MIR- és a Raman-spektrumok értékelése – hatékony, új módszereket dolgoztak ki. Ezen spektrumelemző eljárások révén bonyolult mátrixok esetén is (pl. biológiai objektumok) lehetővé vált a megfelelő mélységű tudományos értékelés.

Ezen összefoglaló fejezet célja annak bemutatása, hogy a közeli infravörös spektroszkópia milyen fontosabb kutatási, minőségi és mennyiségi analitikai, valamint folyamatellenőrzési és folyamatirányítási célokat szolgálhat, s milyen irányokba fejlődik.

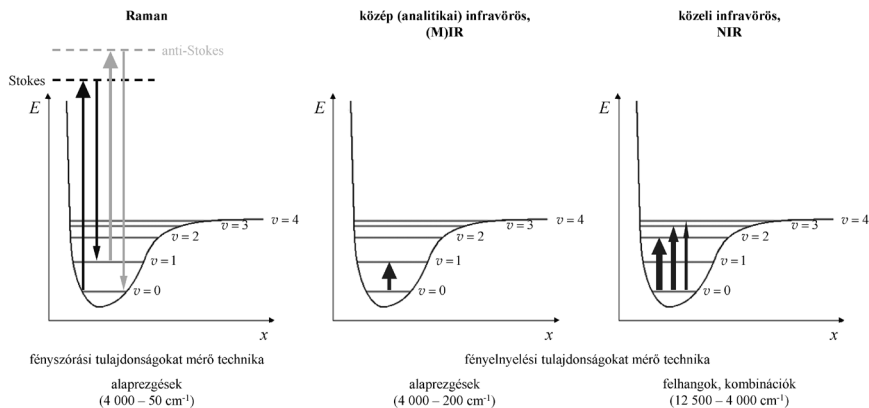
### 9.2. A NIR-módszerek alapjai

A rezgési (vibrációs) spektroszkópia elméleti alapjait egy sor irodalmi forrás részletesen tárgyalja,<sup>1-4</sup> a következőkben itt csupán az alkalmazás szempontjából fontos, néhány vonatkozást kívánunk kiemelni.

Amíg a MIR- és NIR-technika a gerjesztés következtében mérhető abszorpciós jellegű változásokat detektálja, addig a Raman-módszer a fényszórási tulajdonságokat méri (9.1. ábra).

A molekularezgések elméleti tárgyalását a harmonikus oszcillátor modell alapján tehetjük meg, amely modell követi a Hooke-törvényt. A legegyszerűbb esetben az oszcillátor két tömegpontból áll (9.2. ábra), és rezgési frekvenciája ( $\nu$ )

$$\nu = \frac{1}{2\pi} \sqrt{\frac{k}{\mu}}, \quad (9.1)$$

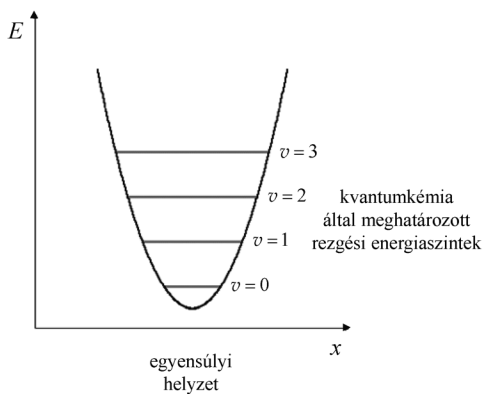


9.1. ábra. Abszorpció és fényszórás változásai a gerjesztés során,  $E$  a potenciális energia,  $x$  a tömegpontok közti távolság,  $v$  a vibrációs kvantumszám

ahol

$$\mu = \frac{m_1 m_2}{m_1 + m_2} \quad (9.2)$$

a redukált tömeg,  $k$  a kémiai kötés erőállandója.



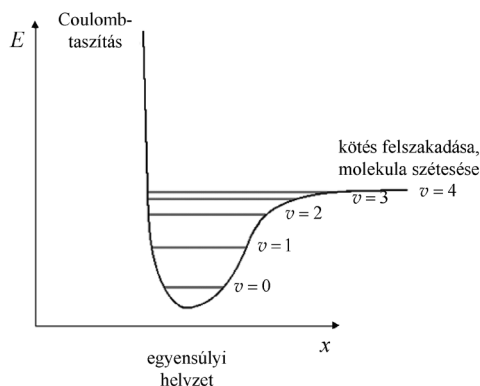
9.2. ábra. A harmonikus oszcillátor energia-kötéstávolság összefüggése,  $E$  a potenciális energia,  $x$  a tömegpontok közti távolság,  $v$  a vibrációs kvantumszám

A vibrációs energia az alábbi összefüggéssel írható le:

$$E_v = h\nu \left( v + \frac{1}{2} \right), \quad (9.3)$$

ahol  $v$  a vibrációs kvantumszám,  $\nu$  az oszcillátor rezgési frekvenciája.

A molekulák valós viselkedését az anharmonikus oszcillátor modell (9.3. ábra) jobban közelíti.



9.3. ábra. Az anharmonikus oszcillátor energia-kötéstávolság összefüggése,  $E$  a potenciális energia,  $x$  a tömegpontok közti távolság,  $v$  a vibrációs kvantumszám

Az anharmonikus vibrációs energiája

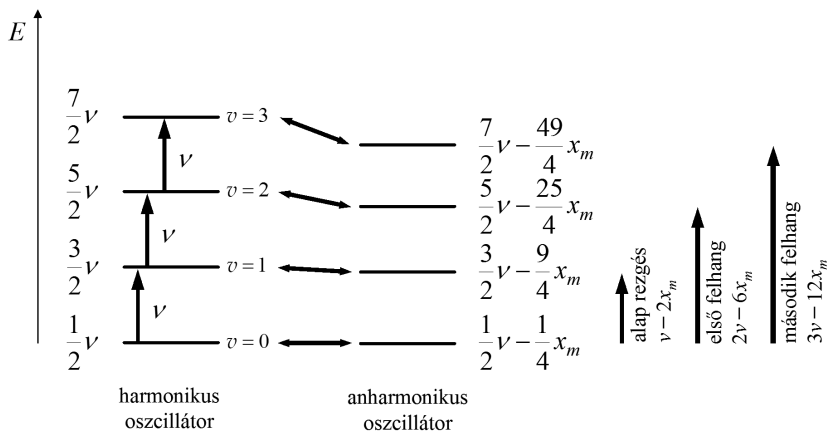
$$E_v = hv \left( v + \frac{1}{2} \right) - x_m hv \left( v + \frac{1}{2} \right)^2 \quad (9.4)$$

formában adható meg, ahol  $v$  a vibrációs kvantumszám,  $\nu$  az oszcillátor rezgési frekvenciája,  $x_m$  az anharmonicitási konstans (0,005-0,05), ami a molekulaszervezettől és molekuláris környezettől erősen függő tulajdonság.

A harmonikus és anharmonikus oszcilláció energiaviszonyait a 9.4. ábra szemlélteti.

A fentiek kiterjeszthetők a több tömegpontból álló oszcillátorra, ami a többatomos rezgő molekulák modellje. Levezethető, hogy egy nem lineáris  $N$  atomos molekula  $3N-6$ , míg egy lineáris molekula  $3N-5$  rezgési szabadsági fokkal rendelkezik, mozgása ennyi normálrezgésre bontható. A rezgési átmenetek során azonban a vibrációs kvantumszám változása  $\Delta v = \pm 2, \pm 3, \dots \pm n$  is lehet, ezek az első, második,  $\dots$   $n$ -edik felharmonikus rezgések, más néven rezgési felhangok.

A felharmonikusok mellett kombinációs rezgések is létrejönnek. Kombinációnak nevezzük, ha több rezgés gerjesztődik egy-egy vagy több kvantummal. A felharmonikus sávok intenzitása erősen függ az anharmonicitástól: ha nagyobb mértékben anharmonikus a rezgés, nagyobb intenzitású sáv várható a spektrumban. A magasabb rendű felharmonikus és kombinációs rezgési átmenetek valószínűsége a



9.4. ábra. A harmonikus és anharmonikus oszcillátor energiaszintjei,  $E$  a potenciális energia,  $\nu$  a rezgési frekvencia,  $\nu$  a vibrációs kvantumszám,  $x_m$  az anharmonicitási konstans

vibrációs kvantumszám növelésével csökken, az abszorpciós sávok intenzitása ennek megfelelően csökken. A felharmonikus és kombinációs sávok általában erősen átfednek, ami erősen csökkenti a NIR-spektroszkópia specifikitását, és néha megnehezíti az észlelt változások értelmezését. Ezek a körülmények hosszú ideig korlátozták a NIR-technikák szélesebb körű elterjedését. A korszerű kemometriai, diszkriminációs és kvantitatív adatfeldolgozási módszerek azonban lehetővé tették a MIR- és a Raman-spektrumok sávjaihoz képest kisebb intenzitású, bonyolultabb NIR-jelsorozatok értelmezését.

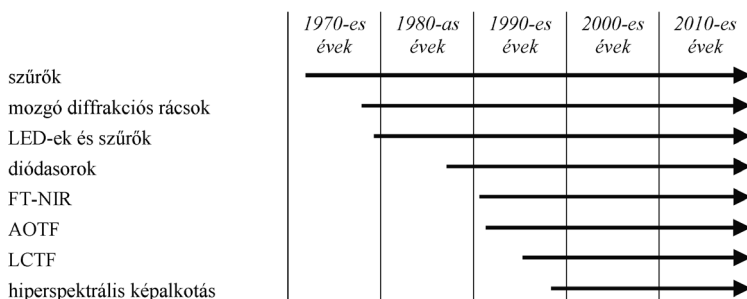
A felharmonikus és kombinációs rezgések mellett néhány további hatás is megjelenik a vibrációs spektrumokban.

- A Fermi-rezonancia jelenségét akkor tapasztaljuk, ha egy felharmonikus vagy kombinációs sáv azonos szimmetriát és frekvenciát mutat, mint az alaprezgés, aminek következtében (rezonancia) két relatív erős abszorpciós sáv képződik.
- A Darling–Dennison-rezonancia minden olyan esetben felléphet, ahol szimmetrikusan egyenértékű X–H kötések találhatóak (pl. vízmolekula). A különféle vegyértékrezgések kölcsönhatása azonos intenzitású páros NIR-abszorpciós sávokat eredményez.

Összehasonlítva a NIR-, MIR- és Raman-technikák tulajdonságait megállapítható, hogy a NIR felharmonikus és kombinációs rezgési sávjai a kisebb intenzitásuk ellenére jól alkalmazhatók minőségi és mennyiségi elemzések céljaira, annak ellenére, hogy nagy rétegvastagságú (akár cm-es) minták esetén az anyagi heterogenitás jelentős. A MIR- és Raman-

spektrumok inkább szerkezetvizsgálati célokra, funkció csoportok azonosítására alkalmazhatók.

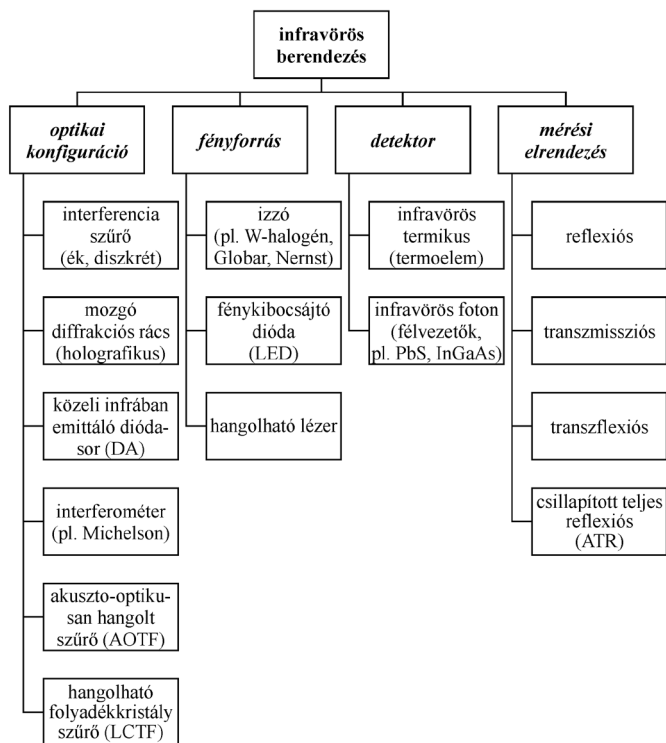
A kutatási és ipari célú alkalmazások során a mintaelőkészítés feltételei döntőek lehetnek. A NIR- és Raman-technikák ilyen tekintetben előnyösek (nem vagy alig igényelnek minta-előkészítést) a MIR-módszerekhez képest. Az utóbbival kapcsolatban azonban meg kell jegyezni, hogy az elmúlt évtized fejlesztéseképp megjelent az ún. csillapított teljes reflexió (ATR = attenuated total reflection) technika, ami a MIR-tartományú mérések esetén is áttörést eredményezett a mintakezelésben.



9.5. ábra. A NIR-technikák fejlődése

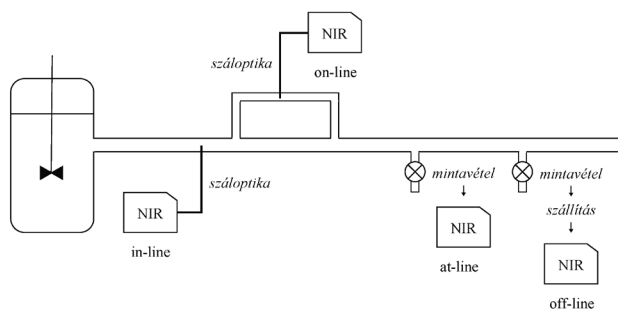
Ha visszatekintünk, alig negyven éve jelentek meg az első, kereskedelmi forgalomba kerülő NIR-spektrofotométerek (9.5. ábra), melyeket gabonák és olajos magvak elemzésére használtak. Ehhez Karl Norris – akit méltán aposztrofálnak a NIR-technika atyjának – két, forradalmi változásokat jelentő újítása szükségeltetett: az egyik a diffúz reflexió mérés technika, a másik a több hullámhosszt használó kalibrációs módszer kidolgozása volt – ez utóbbi tulajdonképpen az első kemometriai módszernek tekinthető e téren. A korai '70-es években mutatták be az első, még kissé kezdetleges, interferenciaszűrő-alapú készülékeket. A NIR-technika szélesebb körben való elfogadtatása lassú folyamat volt, de a készülékek (9.6. ábra) és a kemometriai módszerek fejlődése exponenciális növekedést hozott az alkalmazások számában és sokféleségében. Ennek köszönhető, hogy napjainkban több mint 60 gyártó kínál NIR-spektrofotométereket, számos közülük több modellt is.

A NIR-módszerek leginkább látványos előretörése a folyamatirányítás terén figyelhető meg. A klasszikus mintavételek helyett alkalmazható kvarcszál-optikás mérések bármilyen (folyadék, szilárd, koloid, fázisátalakulásban levő) anyagok mérésére lehetőséget nyújtanak akár in-line, akár on-line módszerrel (9.7. ábra).



9.6. ábra. A NIR-tartományban működő berendezések csoportosítása

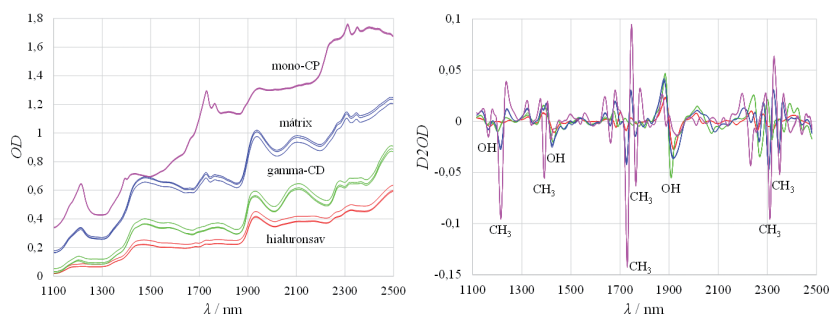
A spektrumok valós információtartalmát azonban nem mindig egyszerű felismerni, a bennük rejlő hordozott információkat gyakran különféle transzformációs módszerek, „lényegkiemelő” eljárások alkalmazásával lehet hatékonyan kinyerni. A transzformációs módszerek széles tárházából érdemes kiemelni a spektrumok deriválásával (pl. első és második deriváltak, 9.8. ábra), az optikai szóródás korrekciójával (pl. többszörös



9.7. ábra. A NIR-készülékek elhelyezkedése a vizsgálandó folyamathoz képest



szóródási korrekció), valamint az adatredukciós módszerekkel (pl. euklideszi távolság, Mahalanobis-távolság, „polár távolság” számítások) végzett eljárásokat, amelyek segítségével olyan transzformált spektrumokat vagy adatsorokat nyerhetünk, amik nagyságrendekkel több információt jeleníthetnek meg, mint maga a primer spektrumsereg.



9.8. ábra. A kezeletlen (ún. alap) és simítással kombinált második derivált spektrumok,  $\lambda$  a hullámhossz,  $OD$  az optikai sűrűség,  $D^2OD$  az optikai sűrűség 2. deriváltja

A spektrumokban rejlő információtartalom kiemelésének egy további hatékony útja a főkomponens-analízis (PCA = principal component analysis). A főkomponens-analízis egy olyan klasszifikációs módszer, ami a spektrumok matematikai változékonyságának elemzésével a lényeges (nagy változékonyságú) és lényegtelen (változékonyságot nem hordozó, kollineáris) részletek megkülönböztetésére nyújt lehetőséget.

A kvantitatív összefüggéseket különféle regressziós módszerek alkalmazásával határozhatjuk meg.

Az egyes gyógyszeripari alkalmazásoknál használható kvalitatív és/vagy kvantitatív kemometriai és matematikai-statisztikai módszereket az adott helyen részletesebben tárgyaljuk.

### 9.3. A NIR-spektroszkópia kvalitatív módszerei

A NIR-spektrumok kvalitatív analízis céljaira való felhasználásának alapja a spektrum (mint kémiai és fizikai ujjlenyomat) alakfelismerése, amit a kémiai, biológiai és élelmiszer-tudományokban széleskörűen alkalmaznak. Kétféle változata terjedt el:

- a nem felügyelt vagy nem irányított alakfelismerés, ahol a spektrumokat, mint információ forrásokat minden előzetes ismeret

nélkül használjuk, és végezzük el a csoportosítást, alakítjuk ki a klasztereket;

- a felügyelt vagy irányított alakfelismerés esetén előzetes kategorizálás (csoportosítás) alapján ún. „tanító” mintasereget használunk, és az ennek alapján kialakított modellt használjuk minősítési célokra.

Mindkét módszer széleskörűen alkalmazható a gyógyszeripari gyakorlatban anyagazonosításra, nyersanyagok és termékek minősítésére.

### 9.3.1. Az alkalmazott kemometriai módszerek

A kvalitatív spektrumelemzések nem felügyelt változatában jellemzően használt módszer a főkomponens-analízis (PCA), ahol a teljes változékonyságot független ortogonális főkomponensek (látens változók vagy faktorok) mentén az új változók lineáris kombinációjaként írjuk le, és ábrázoljuk. A főkomponens-analízis módszerével a sokváltozós adatsorok kevés dimenziós térben is leírhatóvá válnak a nagymértékű adatredukciónak köszönhetően.

A felügyelt vagy irányított klasszifikációs módszerek sorában különbséget kell tennünk aszerint, hogy:

- a módszer lényege a különbségtétel (pl. diszkriminanciaanalízis, DA = discriminating analysis) vagy a csoporton belüli hasonlóság kimutatása (pl. osztályanalógiák közvetett modellezése, SIMCA = soft independent modelling of class analogy);
- lineáris vagy nemlineáris az alkalmazott módszer;
- paraméteres vagy nemparaméteres számításról van-e szó.

Ebben a csoportban jellemzően használt a korreláción, a távolságon alapuló módszerek, a DA-, ill. a SIMCA-eljárások.

A korreláción vagy távolságon alapuló módszerek lényege az egyes objektumok csoportokba (klaszterekbe) rendezése hasonlóság vagy különbség alapján. Ennek kifejezésére a korrelációs koefficiens (R) vagy a csoportok (vagy elemek) euklideszi vagy Mahalanobis-féle távolsága lehet. Ilyenkor szükséges definiálni azt a határértéket, amelyen belül az összehasonlított spektrumok azonos besorolást (osztály vagy csoport) nyernek. Az európai előírások (EMEA) szerint 95%-os határértéket „illik” használni korreláció vagy maximális hullámhossztávolság számítás esetén.<sup>5</sup>

A diszkriminanciaanalízis (DA) egy olyan lineáris paraméteres módszer, ahol az egyes csoportok (vagy osztályok) közötti kapcsolatot (összefüggés, távolság) azon kiválasztott irányok mentén jellemezzük,

ahol a csoportok közötti elkülönülés a legnagyobb. Az elkülönülés számításának alapja a spektrumok közötti euklideszi távolság.

A hasonlóságvizsgálat (SIMCA) módszere olyan paraméteres modellezésen alapuló eljárás, ahol az egyes csoportokra főkomponens-analízist végzünk, és a nyert főkomponens-modelleket használjuk az ismeretlen minta elemzésére. Amelyik modellel a legkisebb maradék (reziduális) eltérést érjük el, ahhoz hasonlít legjobban az ismeretlen minta.

Ezen módszerek széleskörűen alkalmazottak különféle hordozók, szarshatások és beszállítók közötti különbségek kimutatására.

## **9.3.2. A kvalitatív NIR-módszerek gyógyszeripari alkalmazásai**

### **9.3.2.1. Anyagazonosítás, minősítés**

A gyógyszeripari gyakorlat számára az ICH (International Conference on Harmonization) előírásai ( $Q_2$ ,  $Q_6$ ,  $Q_7$ ) meghatározzák azokat az analitikai eljárásokat, amiket a nyersanyagok, szélesebb értelemben a gyártás anyagainak azonosítása, minősítése során használni kell. A Pharmacopoeiák ilyen célokra általában folyadékkromatográfiás, optikai forgatóképesség mérésén alapuló és kolorimetriás módszereket javasolnak.

Az Európai Gyógyszerkönyv<sup>6</sup> több mint egy évtizede lehetővé teszi a NIR-módszerek alkalmazását anyagazonosítási célokra, ami kiterjedhet hatóanyagok (API = active pharmaceutical ingredient), intermedierek, hordozók, töltő és segédanyagok, késztermékek vizsgálatára.

A NIR-módszerek alkalmazásának nyilvánvaló előnye a gyorsaság és roncsolásmentes jelleg. A kémiai azonosítás mellett a NIR-technika lehetőséget nyújt egyes fizikai tulajdonságok (szemcseméret, sűrűség, morfológia stb.), mint azonosításra alkalmas jellemzők detektálására is.

Az azonosítás céljaira alkalmas spektrumkönyvtár-építés és validálás azonban egy sor előzetes körülmény vizsgálatát igényli:

- a könyvtár célja, használati iránya;
- mintaválogatás a jellemző spektrumú anyagok szelektálása céljából, valamint a kalibráció külső és belső validálás céljaira;
- a spektrumkezelés optimalizálása;
- a klasszifikációs algoritmusok kiválasztása;
- a határértékek (threshold) meghatározása;
- fenntartás, aktualizálás.

A könyvtárszerkezetet és használatának céljait a felhasználó határozza meg.

A könyvtárépítéshez használandó mintákat célszerűen két független csoportba (könyvtár és külső validáló mintasereg) kell besorolni, ill. válogatni.

A könyvtárba a tipikus változékonyságot mutató ún. betanító mintákat helyezzük, azonosításhoz anyagonként minimum 3, minősítéshez minimum 20 darabot.<sup>7</sup>

A spektrum-előkezelés kiválasztása erősen alkalmazásfüggő. Azonosítás esetén általában első- vagy másodikderivált-képzést és szóródási korrekciót alkalmazunk a fizikai hatások csökkentésére vagy eliminálására.<sup>8</sup>

A klasszifikációs módszerek választása képezi a könyvtárkialakítás lényegét.

Azonosítási célú könyvtár esetén a hullámhossz-illeszkedés korrelációját számítjuk második derivált spektrumok felhasználásával. Minősítési célú könyvtárak esetében a SIMCA-módszer a leggyakrabban használt klasszifikációs algoritmus.<sup>9</sup>

A '90-es években<sup>10</sup> került bevezetésre az ún. hasonlósági megközelítés és az ún. hasonlósági index (CI = conformity index) az anyagazonosítás területén. A CI az a legnagyobb hányados érték, amit egy spektrum hullámhossz-skálája mentén képezünk úgy, hogy minden hullámhossznál a számlálóban a minta és a referenciaanyag abszorpciókülönbsége, míg a nevezőben a referenciaspektrum szórása van. A CI hullámhosszfüggvénye a kémiai és fizikai okok felderítésében is fontos információforrás lehet (pl. kristályállapot).

A spektrumkönyvtár fejlesztési és optimalizálási stratégiáit több irodalmi forrás részletesen tárgyalja.<sup>11</sup> Az anyagazonosítás módszereit például hamis tabletták esetén is alkalmazhatjuk, ezen módszereket azonban külön fejezetben tárgyaljuk.

### **9.3.2.2. Polimorfia**

A gyógyszeripari termékek stabilitása és oldhatósága nagymértékben függ a kristályformától. Különbféle kristálymódosulatok, polimorfok alakulhatnak ki (vagy alakulhatnak egymásba) az előállítás, tárolás során, és ezen átalakulások kimutatására a MIR- és Raman-módszereken túl a NIR-technika is alkalmas. Több irodalmi hivatkozás található antibiotikumok,<sup>12,13</sup> teofillin és laktóz<sup>14</sup> amorf, ill. kristályos módosulatainak kimutatására.

### 9.3.2.3. Egyéb kvalitatív célú alkalmazások, hamisítások, eredetvizsgálat

A kizárólag NIR-spektrumok alapján történő azonosítás és minősítés speciális esetei:

- a termelő helyek megkülönböztetése, azonosítása;
- hamisított termékek azonosítása (hatóanyag, tablettá);
- eredetiségvizsgálat;
- termelési, előállítási sarzsok közötti különbség technológiai okainak megértése és mértékének kimutatása (homogenizálás, granulálás, préselés, bevonás időfüggései; biotechnológiai esetekben a baktériumtörzsek azonosítása).

A hamisítások, ill. eredetiség kimutatására, vagyis a valódi (eredeti), az imitáció és a hamis termékek megkülönböztetésére a NIR széleskörűen alkalmazható,<sup>15</sup> hiszen ezzel a mérés technikával a kémiai szempontból más, vagy eltérő minőségű hatóanyagot, adalékanyagot, hordozót, vagy éppen a hatóanyag hiányát könnyen ki lehet mutatni. A spektrumok kemometriai klasszifikációja során jellemzően hullámhossz- korrelációs számítás és főkomponens-analízist (PCA) alkalmaznak a megkülönböztetésre, ill. csoportba sorolás során. Az eredeti anyagokra felépített spektrumkönyvtár esetén az „azonosság” feltételeként nagyon magas ( $R > 0,99$ ) határértéket szükséges definiálni. A biztosan azonos objektumok kijelölése után lépésenkénti főkomponens-analízis alkalmazásával lehet elkülöníteni a további minőségileg különböző csoportokat, klasztereket.

A minőségi elemzések során néhány általános, gyakorlati szempontból fontos körülményt érdemes szem előtt tartani:

- mintakezelés során azonos méretű, rétegvastagságú, lehetőleg állandó szemcseméretű és kristályformájú mintát használjunk;
- a spektrumok előkezelése során normalizálás (SNV = standard normal variate) és szóródási korrekció (MSC = multiplicative scatter correction) számítása és derivált képzése javasolt;
- a könyvtárkészítés során az összes lehetséges változékonyságot figyelembe kell venni (anyagi, operátor, idő, készülék stb.) min. 5-10 különböző sarzs használatával;
- a spektrumkönyvtárak rendszeres aktualizálást, ellenőrzést igényelnek;
- a könyvtárak más készülékekre való átvitele (transzfer) speciális ellenőrzési műveleteket igényel.<sup>16</sup>

## 9.4. A NIR-spektroszkópia kvantitatív módszerei a gyógyszer vizsgálatokban

A NIR-spektroszkópia kvantitatív alkalmazásának előfeltétele, hogy összefüggést találjunk a spektroszkópai adatmátrix (értsd: spektrumok) és az ún. referencia adatmátrix (értsd: azon jellemzők, amit vizsgálni kívánunk) között, vagyis a NIR-technika közvetett (indirekt) módszer. Az összefüggések kimunkálásához különféle lineáris és nemlineáris regressziós módszereket használhatunk.

### 9.4.1. A kvantitatív elemzés regressziós módszerei

A többszörös lineáris regresszió (MLR = multiple linear regression) módszere azon alapul, hogy a meghatározni kívánt komponens ( $y$ ) koncentrációja egyes kiválasztott hullámhosszaknál mért optikai jelekkel (értsd: spektrumintenzitás) lineárisan korrelál:

$$y = b_0 + b_1x_1 + b_2x_2 + \dots + b_nx_n, \quad (9.5)$$

ahol  $b_0 \dots b_n$  a számított koefficiensek,  $x_1 \dots x_n$  az adott hullámhossznál mért intenzitásértékek.

Az ezen hullámhosszaknál mért intenzitások alapján az illető jellemző prediktálható. A módszer tehát a spektrum bizonyos hullámhosszúságú adataival számol (azokkal, ahol maximális a korreláció), a többi kis vagy nulla információtartalmú (ún. kollineáris) szakaszait nem veszi figyelembe, vagyis hullámhossz-választásos módszerről beszélhetünk.

A főkomponens-regresszió (PCR = principal component regression) során előbb a spektroszkópai mátrix redukcióját végezzük el úgy, hogy az eredeti spektroszkópai változók felhasználásával egy főkomponens-mátrixot hozunk létre, ahol sokkal kevesebb látens változó ( $t$ ) vagy más néven faktor segítségével írjuk le a spektroszkópai változékonyságot. Ezt követően a látens változók alapján számítjuk a korrelációt:

$$y = b_0 + b_1t_1 + b_2t_2 + \dots + b_nt_n, \quad (9.6)$$

ahol  $b_0 \dots b_n$  a számított koefficiensek,  $t_1 \dots t_n$  a látens változók.

Ezen módszer esetén minden spektroszkópai adatot megtartunk, de azok „súlya” a számítás során változik. Meg kell jegyezni, hogy a látens változók nem feltétlen rendelhetők valós kémiai vagy fizikai tulajdonságokhoz, azok matematikai változékonyságot írnak le.

A részleges legkisebb négyzetek (PLS = partial least squares) módszere esetén a számítás azon alapszik, hogy a valós spektroszkópiai mátrix és a referencia-adatmátrix egyidejű figyelembevételével számoljuk a kovariancia eredményezte látens változókat, vagyis a látens változók mindkét adathalmaz együttes varianciáját írják le. A PLS-módszerrel nyert modellek pontossága általában kevesebb látens változó figyelembe vétele esetén ér el hasonló pontosságot, mint a PCR-módszer.

A nemlineáris regressziós módszerek közül a NIR-spektroszkópiában nagy adatbázisok és esetleg felmerülő nemlineáris feladatok megoldásában használatos a mesterséges neurális hálózati (ANN = artificial neural network) módszer, ami lényegében egy tanító algoritmus „tréning” fázisa után nyújt lehetőséget predikcióra.<sup>17,18</sup>

Egy további nemlineáris módszer az ún. támogató vektor módszer (SVM = support vector machines), ami egy felügyelt tanító algoritmus, és mind különbségtételi, mind regressziós módszerként alkalmazható.<sup>19,20</sup>

## 9.4.2. Kvantitatív NIR-módszerek gyógyszeripari alkalmazásai

A gyógyszerkutatás és gyógyszer-előállítás egy sor analitikai paraméter gyors, kvantitatív meghatározását igényli, amiben a közeli infravörös spektrumok, mint jelforrások, a meghatározások alapját képezik.

A nedvességtartalom meghatározása volt az egyik első alkalmazás a gyógyszertermékek területén, amit porok, granulátumok, kapszulák, tabletták, liofilizátumok mérésénél alkalmaztak széles körben.<sup>21,22</sup> A víz két jellemző abszorpciós sávja – az 1920 nm környezetében mérhető kombinációs sáv (O–H vegyérték- és O–H deformációs rezgések) és az 1450 nm-nél detektálható első felharmonikus sáv (O–H vegyértékrezgés) alkalmasak a nedvességtartalom pontos mérésére, robusztus modellek kialakítására.

A hatóanyag-tartalom (API), hordozóanyag-koncentráció, maradék oldószer mérésére széleskörűen alkalmazott a NIR-technika. Az alkalmazások esetről esetre önálló elemzést igényelnek, a megoldások nagy többségében PLS az alkalmazott regressziós módszer.<sup>16</sup> Széleskörű összehasonlítást találunk az irodalomban a NIR-, FT-NIR-, FT-IR- és FT-Raman-technikák, a reflexiós és a transzmissziós módszerek, ill. a különféle spektrométerek tekintetében a kvantitatív mérések megbízhatósága szempontjából.<sup>23</sup>



Egy sor fizikai tulajdonság is meghatározható NIR-spektrumok felhasználásával.

A tablettakeményesség, a préselési erő és a kioldódási profil<sup>24</sup> mérésére alkalmas kalibrációk kerültek kidolgozásra PLS-módszerek használatával. A NIR-spektrumokban rejlő információk felhasználhatók például a szemcseméret meghatározására.

Nemcsak a különböző polimorf anyagváltozatokat lehet megkülönböztetni a NIR-spektrumuk alapján, hanem az amorf/kristályos formák arányát is ki lehet mutatni NIR-módszerekkel. A NIR-alapú kvantitatív modellek kb. azonos pontosságúak, mint a röntgendiffrakciós módszereknél alkalmazott modellek.<sup>25</sup> A polimorf formák arányának meghatározása segíthet a hamisítások kimutatásában is. Használják a NIR-módszereket a feldolgozás során fellépő kristályállapot-változások kvantitatív követésére is.

Jó példa az előzőek bemutatására a gyógyszertermékek formulálása során széleskörűen alkalmazott művelet, a liofilizálás. A művelet során megmaradó nedvességtartalom érzékenyen mérhető NIR-eljárásokkal, ami kiválthatja a hosszadalmasabb Karl Fischer-titrálást, termogravimetriás vagy gázkromatográfiás módszereket.<sup>26,27</sup> A NIR-technika előnye hogy nemcsak a nedvesség kvantitatív meghatározása, hanem a vízállapot jellemzése (a víz kötöttségi állapotának meghatározása) is lehetséges a NIR-spektrumrészletek alapján.<sup>28</sup> A liofilizálás során a kristályos fázis aránya is megváltozhat, ennek mérése is lehetséges NIR-spektrumok alapján.

Fehérjék fagyasztva szárítása során a fehérjék szerkezete megváltozhat. A szárítás eredményezte sérülés, ill. a hő hatására fellépő denaturáció kimutatása, szintén lehetséges NIR-módszerek alkalmazásával.<sup>29</sup> Az  $\alpha$ -hélixek és  $\beta$ -redők jellegzetes, asszignálható abszorpciót mutatnak a NIR-tartományban, sőt a fehérjék magasabb rendű szerkezete is detektálható.<sup>30</sup>

A liofilizálási folyamat NIR-monitorozásával kimutatható a jégképződés kezdete, a jégállapot teljes kialakulása és a szublimációs lépés is követhetővé válik.<sup>31</sup>

A kvantitatív módszerek használatának fontos gyakorlati aspektusa az a tény, hogy a kidolgozott predikciós modellek pontosságát alapvetően az alkalmazott referenciamódszerek pontossága korlátozza. A predikció statisztikai jellemzésére és értékelésére egy sor paraméter alkalmas:

- a kalibráció standard hibája (SEC = standard error of calibration);
- a keresztvalidálás standard hibája (SECV = standard error of cross-validation);
- a predikció standard hibája (SEP = standard error of prediction);



- a lineáris korrelációs koefficiens, ill. ennek négyzete ( $R$ ,  $R^2$ );
- a torzítás (bias);
- maradék predikciós eltérés (RPD = residual predictive deviation).

A felsorolt statisztikai jellemzők definíciója Næs és mtsai.<sup>32</sup> összefoglaló tanulmányában részletesen megtalálható.

## 9.5. A NIR-módszerek minőségvezérelt in-line és on-line módszerei, ill. alkalmazásai

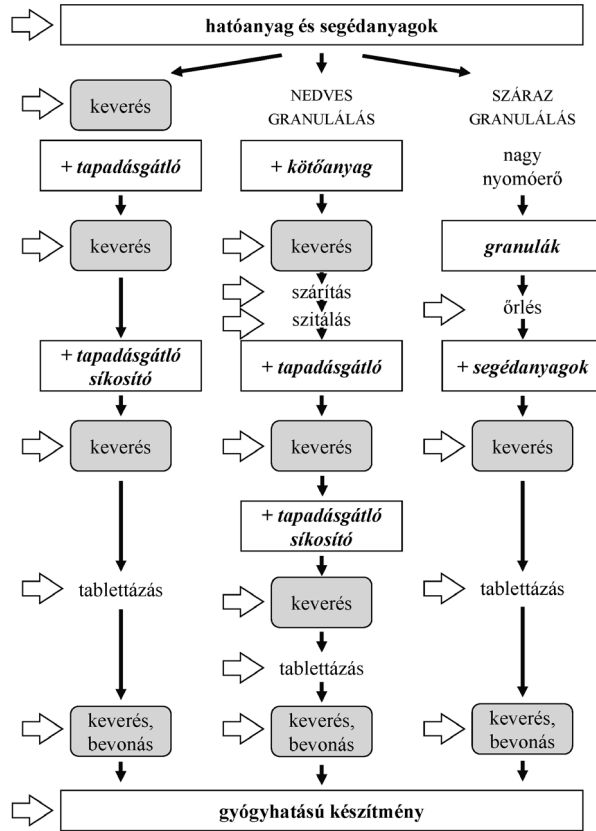
A NIR-módszerek fejlesztése eredményeképp a gyógyszer-előállítás szinte minden fázisában, műveletében lehetőség nyílik ezen gyors, roncsolásmentes technika alkalmazására (9.9. ábra). Jellemző alkalmazási területek a porkeverés, granulálás, szárítás, kristályosítás, bevonás, csomagolás, valamint a különféle biotechnológiai műveletek.

A porkeverés a gyógyszeripari műveletek kritikus lépése, amivel a hatóanyag (és egyéb komponensek) egyenletes eloszlását, homogenitását kívánjuk biztosítani. A keverés hatékonyságának (homogenitás) vizsgálata során kritikus, hogy reprezentatív legyen a mintavétel, és minimális legyen a szemcseméret-különbségekből adódó „osztályozódás”.

Jellemzően száloptikás, reflexiós elven működő ún. interactance szondákat használunk a NIR-spektrumok felvételére,<sup>33</sup> a homogenitás/heterogenitás kimutatására. Ha a keverés közben aggregáció lép fel és inhomogénné válik az anyageloszlás, az kvalitatívan kimutatható NIR-szondák segítségével. Az inhomogenitások lokális kimutatására NIR-alapú képpalkotó eljárások (imaging spectroscopy) használhatók.<sup>16</sup>

A keverést követő granulálási lépés kulcsparamétere (akár száraz, akár nedves granulálás esetén) a granulátum nedvességtartalma, ill. annak időbeli változása. In-line reflexiós NIR-módszerekkel a nedvességtartalom fluidágyas granulálás során is jól detektálható, a porlasztási és szárítási fázis követhető, a szárítás végpontja jelezhető.<sup>34</sup> A nedvességtartalom mérése mellett a szemcseméret és a kötőanyag-alkalmazás hatásai is követhetők a NIR-spektrumok alapján.<sup>34,35</sup>

A szárítási műveletek a gyógyszer-előállítás időt rabló műveletei, és a klasszikus destruktív analitikai eljárások (többnyire Karl Fischer-titrálás) nem garantálják a mérési megbízhatóságot az egész sarzsra vonatkozóan. Ezért az in-line NIR-eljárásokat széleskörűen használják a maradék nedvességtartalom monitorozására.<sup>36,37</sup>



9.9. ábra. A NIR-spektroszkópia lehetséges alkalmazásai (⇒) a gyógyszer-előállítás során

A szárítási fázisban a hatóanyag(ok) vagy hordozóanyag(ok) polimorf módosulatai egymásba is átalakulhatnak. A kristályállapotok közötti átalakulásokat on-line NIR-módszerrel követni lehet pl. glicin esetében, kihasználva a H-kötések rendszerének változását.<sup>38</sup>

A szilárd formulált termékek, tabletták, granulátumok, mikrokapszulált anyagok NIR-alapú minősítése a '80-as évek közepe óta fokozatosan vált gyakorlattá, az alkalmazások szinte esetről-esetre egyedi vizsgálatokat és megoldásokat igényelnek.<sup>33</sup>

A szilárd formulált termékek gyártás közbeni analízismódszereinek NIR-változatai<sup>39</sup> egyre nagyobb arányban integrálódnak a folyamatfelügyelő, -analizáló technológiák (PAT = process analitical technology) 2004-ben elfogadott rendszerébe. Az ún. eredeti adagolt formák (intact dosage forms) kapszulák és tabletták bevonás előtti ellenőrzésére (ha

van ilyen művelet) a NIR többparaméteres (hatóanyag, hordozóanyag koncentráció, keménység, nedvességtartalom, kioldási sebesség stb.) kvantitatív módszerei lehetőséget nyújtanak, ill. alapul szolgálhatnak az „elfogadás” vagy „visszautasítás” kérdésének eldöntésében.<sup>33</sup> A döntések meghozhatók sarzsonként vagy akár objektumonként (tabletta, kapszula) is. Az objektumonkénti meghatározások egyik előnye, hogy az in-line alkalmazások során a reflexiós technika kevésbé érzékeny a minta pozicionálás feltételeire.<sup>40</sup> A tablettá- vagy kapszulavizsgálatok NIR-analízisének egyik legnagyobb hibaforrása a mintapozicionálás és a vizsgált objektum geometriai tulajdonságbeli különbségei. Az íves mintafelszín, ferdültség, rovasok, karcolások, nyomatok hatásait a spektrumok előkezeléseivel lehet csökkenteni, ill. kezelni.

A gyógyszer-előállítás fontos minőségmeghatározó lépése a bevonás. Ennek integritása és minősége biztosítja a megfelelő hatóanyag-leadást és -stabilitást. A bevonat minősítésére alkalmazott diffúz reflexiós NIR-eljárások általában a bevonatminőség és -vastagság mérésére is alkalmasak. A bevonás művelete követhető NIR-spektroszkópiai módszerekkel, mely során a változás olyan modellel írható le, amelyben a korpusz egy jellemző komponensének abszorpciós sávja csökken, míg a bevonó anyag jellemző abszorpciós sávja növekszik.<sup>41</sup> A bevonás minőségét, ill. hibáit NIR-mikroszkópiai módszerrel tudjuk megbízhatóan ellenőrizni.

A csomagolás, ill. a csomagolóanyagok ellenőrzésére reflexiós NIR-eljárások vagy NIR-kamerák alkalmasak, ahol az objektumról készített NIR-spektrumot az ismert tulajdonságú, a könyvtárban azonosított csomagolóanyagok spektrumaival hasonlítjuk össze, majd a hasonlóság mértékét statisztikai paraméterekkel jellemezzük.

Az in-line és on-line NIR-fejlesztések, -alkalmazások egy rendkívül gyorsan fejlődő, különleges igényű területe a biotechnológiai hatóanyagok előállítása. Ennek oka az, hogy a biotechnológiai eljárások folyamatellenőrzése és folyamatmonitorozása is megvalósítható a NIR-spektrumokban rejlő kvalitatív és kvantitatív információk alapján. A 2000-es évek elején indult fermentációs és gyógyszeripari alkalmazások néhány jellemzőjét mutatja be a 9.1. táblázat.

A többnyire száloptikás módszerrel, on-line módon gyűjtött NIR-spektrumok jellemző feldolgozása PLS-módszerrel történik, vagy a spektrum közvetlen felhasználásával, vagy a mért spektrumból a víz spektrumának kivonása után megmaradó jelsorozat alapján.

A klasszikus mikrobiológiai alapú fermentációk mellett, az utóbbi évtizedben, az emlőssejtes és rovarsejtes fermentációval előállított

9.1. táblázat. A NIR-technika jellemző biotechnológiai alkalmazásai

Mikroba	Termék	Detektált jellemzők	Hullámhossz tartomány / nm	Referencia
<i>E. coli</i>	antibiotikum	sejttömeg, glükóz, acetát,	400-2500	Cimander és Mandenius <sup>42</sup>
		triptofán, foszfát		Gergely és mtsai. <sup>43</sup> Párta és mtsai. <sup>44</sup>
<i>Vibrio cholerae</i>	toxin, plazmid	sejttömeg, glükóz, acetát	400-1500	Navratil és mtsai. <sup>45</sup>
<i>Staphylococcus</i> és <i>Lactobacillus</i>	savak	sejttömeg, glükóz, tejsav, ecetsav	700-1800	Tamburini és mtsai. <sup>46</sup>
<i>Staphylococcus xylosus</i>	savak	sejttömeg, glükóz, tejsav, ecetsav	700-1800	Tosi és mtsai. <sup>47</sup>
<i>Sacharomyces cerevisiae</i>	fehérje	sejttörmelék, fehérje, RNS	1900-2500	Yeung és mtsai. <sup>48</sup>

termékek száma növekszik. Emlőssejtes fermentáció monitorozására 400-2500 nm tartományban immerziós szondát használtak Arnold és mtsai.,<sup>49</sup> és a folyamat során glükóz, tejsav, glutamin és ammónia detektálása mellett termeltek fehérje terméket. Immerziós transzflexiós szondával *in-situ* mért (on-line) NIR-spektrumokat használtak Henriques és mtsai.<sup>50</sup> emlőssejtek által termelt monoklonális antitestek előállítására. Rovarsejtek által termelt anyagok fermentációjának monitorozását 2000-2500 nm tartományban valósították meg Riley és mtsai.<sup>51</sup> glutamin és glükóz folyamatos NIR-mérésével.

A biotechnológiai alapú (fermentációs) gyógyszerelőállítás fejlesztésében és fejlődésében az ún. tervezett minőség (QbD = quality by design) koncepció<sup>52</sup> megjelenése új lehetőségeket nyitott meg. A QbD tudományosan megalapozott, veszélybecslő és veszélyelemző, holisztikus és proaktív tervezési eljárás, ill. módszer, aminek értelme a teljes gyártási

folyamat (a termék tervezésétől a kereskedelemig) megértése, tervezése, fejlesztése, elemzése, bizonyítása, validálása és dokumentálása céljából. A gyógyszerek kutatása, előállítása és ellenőrzése szigorúan ellenőrzött, konzervatív rendszerében a NIR-technika megjelenése, éppen a közel valós idejű mérések és folyamatellenőrzési lehetőségek miatt, gyökeresen új helyzetet teremtett. A lehetőség szerint legrövidebb idő alatt történő minőségi és mennyiségi paraméter-meghatározás – azonosítás, tisztaság, minőség, keverési idő, szárítási idő, tablettasúly, keménység, homogenitás (content uniformity), kioldódási sebesség stb. – igénye segítette kialakítani az ún. PAT-koncepciót.

A 2004-ben végleges formára hozott PAT-útmutató (FDA) három kulcskövetelményt fogalmazott meg.

1. A PAT olyan rendszer, ami a megfelelő végtermékminőséget úgy biztosítja, hogy a tervezés, analízis és előállítási folyamatokat az idő függvényében folyamatosan kontrollálja a nyersanyagok, segédanyagok és folyamatok, műveletek tekintetében.
2. A PAT „analitikai” szempontja széleskörűen értendő, ami integrált módon magába foglalja a kémiai, fizikai, mikrobiológiai, matematikai és veszélyelemzési körülményeket. A PAT célja a QbD elvének támogatása, ami a folyamatok részleteinek megértését és azok hatékonyságának maximalizálását célozza.
3. Az útmutató fókusza tehát nem önmagában a „hardver”, hanem sokkal inkább a mérési és elemző koncepció, ami érthetővé és ellenőrizhetővé teszi a folyamatokat.<sup>53</sup>

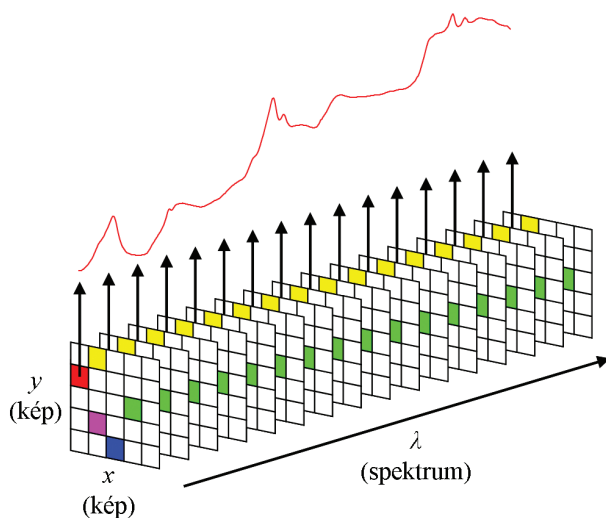
A PAT-koncepció gyógyszeripari bevezetése szükségszerűen igényelte mindhárom fenti pont kielégítését, aminek eszközeképp a NIR-módszerek (és -eszközök) gyorsaságuk és információtartalmuk miatt a PAT megkerülhetetlen eszközeivé váltak.

Meg kell azt is jegyezni, hogy a NIR-módszerek és eszközök fejlesztését is megváltoztatta a PAT-koncepció terjedése. A műszerfejlesztések az egyre kisebb méretű, gyors és speciális (pl. wireless) eszközök fejlődését hozta, amiket a termelő (ellenőrző) vonalak mellett lehet használni, integrálni a PAT-rendszerbe. Az eszközök fejlődése mellett a hardvereket irányító szoftverek innovációjában is megjelent az az új igény, hogy minden pillanatban nyomtatható, a dokumentációt és követhetőséget segítő „paper trial” funkcióval rendelkezzenek.<sup>53</sup>

## 9.6. NIR-képkalkotó (imaging) módszerek

A hiperspektrális képkalkotó eljárások úgy képesek növelni az információsűrűséget, hogy megteremtik a NIR-spektrumok (mint kémiai és fizikai ujjlenyomatok), ill. azok térbeli lokalizációjának kapcsolatát.

A gyógyszeripari és egyéb (biológiai, fiziológiai, orvosi stb.) területeken széleskörűen terjednek a közeli infravörös spektroszkópiai alapú képkalkotó eljárások. A NIR-alapú képkalkotás során egy szokásos kétdimenziós mikroszkópos elemi képmezőben (képpontban) harmadik dimenzióképpen NIR-spektrum kerül felvételre, amint azt a 9.10. ábra mutatja.



9.10. ábra. A NIR-képkalkotó eljárás alapja

A jellemző elemi képmező (pixel) mérete  $6,25 \mu\text{m} \times 6,25 \mu\text{m}$ . Amennyiben egy  $625 \mu\text{m} \times 625 \mu\text{m}$  méretű képmezőt elemzünk, ez  $100 \times 100 = 10\,000$  képpontot jelent, amelybe képpontonként rendszerint 128 párhuzamos spektrum átlagolásával veszünk fel spektrumokat, ami végeredményben óriási mennyiségű adat feldolgozását igényli. A méréssel kialakuló, jellemzően háromdimenziós, hamis színezésű képek kiválóan alkalmasak a vizsgált objektumban található anyagok eloszlásának, homogenitásának vizsgálatára.

A gyógyszerkutatás, gyógyszerfejlesztés és gyógyszer-ellenőrzés széleskörűen tudja használni a képkalkotó eljárások eredményét, mint kiegészítő információkat, a termék- és folyamatelemzés során.<sup>54-56</sup> A perces nagyságrendű időben készített NIR-képkalkotás a formulálás és más

folyamatok kvázi valós idejű ellenőrzését, hibaérzékelését teszi lehetővé.<sup>57</sup> Jól használhatók a NIR-képalkotó eljárások a hatóanyag-dozírozás<sup>58</sup> és a liofilizált anyagok formulálásának<sup>59</sup> ellenőrzésében. A bevonási technológia követése,<sup>60</sup> technológiai hibák, pl. a bevonási műveletek hiányosságainak, okainak elemzése,<sup>61</sup> a nem megfelelő keverési, homogenizálási lépés kimutatása,<sup>62</sup> tabletták, termékek eredeti vagy épp hamis jellegének kimutatásában<sup>63,64</sup> a NIR-képalkotó eljárások új perspektívákat nyitottak.

\*

A közeli infravörös spektroszkópiai technikák, ill. azok speciálisan gyógyszeripari kutatási, alkalmazástechnikai, technológiai előnyeit és hátrányait (korlátait) összegzi a 9.2. táblázat.

9.2. táblázat. A NIR-technika előnyei és korlátai

Előnyök	Hátrányok, korlátok
Roncsolásmentes, neminvazív	0,1% (m/m) koncentráció alatt gyenge jel
Gyors spektrumfelvétel (<1 perc)	Készülék beruházási költsége magas
Alacsony költség, vegyszermentes	Az alkalmazott kemometria módszerek tudásintenzívek
Nagy áteresztőképesség	
Egy spektrum alapján több összetevő mérhető	Statisztikailag reprezentatív, nagy adatbázisok szükségesek
Nem vagy alig szükséges mintaelőkészítés	A modellek állandó fenntartást, recalibrációt igényelnek
Laboratóriumi és ipari környezetben is alkalmazható	A kalibrációtranszfer speciális feltételeket igényel
On-line, in-line, at-line alkalmazások egyaránt használhatók	Pontos referenciamódszereket (kémiai és fizikai analitikák) igényel
Száloptikás módszerekkel <i>in-situ</i> analízis végezhető	„Minden feladat más”, kreativitás és innovációs készség szükséges a feladatok megoldásához
Csomagoláson át is alkalmas mérésre	

Amint a korábbi fejezetekből látható, ez a mérés technika a kémiai, gyógyszeripari, technológiai, mérés technikai, matematikai-statisztikai és kemometriai területek erős kooperációját igényli, és csak megfelelő multidiszciplinaritású ismeretek megléte esetén válik valódi „termelő erővé”. A gyógyszeripar egy sor területén növekszik, és a közeljövőben még gyorsabban fejlődni fog a technika gyakorlati implementációja, aminek egyszerű oka az, hogy a gyártás műveletei igénylik a valós idejű folyamatmonitorozást és az események egyidejű dokumentációját. A gyógyszer-előállítás ellenőrző hatóságok (FDA) is felismerték a NIR-technika speciális előnyeit, és a folyamat- és minőség-ellenőrzésben „alternatív” módszerként fogadják el.

A NIR-spektroszkópia egyre szélesebb körben való gyógyszeripari bevezetése erősíti az ún. „zéró defekt” minőségellenőrzési törekvéseket, ráadásul ez nem jelenti az ellenőrzési költségek növekedését.

Külön említést érdemel a NIR-módszerek gyógyszerkutatói területeken való alkalmazhatósága. A NIR-spektrumok rengeteg rejtett információt tartalmaznak, és ezen információk hatékony „extrahálásával”, a kemometriai módszerek fejlesztésével, az adatbányászat korszerű módszereinek használatával új utak nyithatók eddig elképzelhetetlen alkalmazások irányába.

## 9.8. Irodalom

1. Coates, J. *Appl. Spectrosc. Rev.* **1998**, *33*, 267.
2. Chalmers, J.M.; Griffiths, P.R. *Handbook of Vibrational Spectroscopy*, John Wiley & Sons Ltd.: Chichester, **2002**.
3. Smith, E.; Dent, G. *Modern Raman Spectroscopy – A Practical Approach*, John Wiley & Sons Ltd: Chichester, **2005**.
4. Siesler, H.W. *In Handbook of Near-Infrared Analysis, Third Edition*; Burns, D.A.; Ciurczak, E.W., Ed.; CRC Press: Boca Raton, **2008**; pp. 7.
5. EMEA *Note for Guidance on the Use of Near Infrared Spectroscopy by the Pharmaceutical Industry and the Data Requirements for New Submissions and Variations (EMA/CVMP/961/01)*, EMA: London, **2003**.
6. EDQM *European Pharmacopoeia, 6th Edition*, EDQM: Strasbourg, **2006**.
7. Reich, G. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2005**, *57*, 1109.
8. Candolfi, A.; De Maesschalck, R.; Jouan-Rimbaud, D.; Hailey, P.A.; Massart, D.L. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **1999**, *21*, 115.
9. Kemper, M.S.; Luchetta, L.M. *J. Near Infrared Spectrosc.* **2003**, *11*, 155.
10. Plugge, W.; Van der Vlies, C. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **1993**, *11*, 435.
11. Gerhausser, C.I.; Kovar, K.A. *Appl. Spectrosc.* **1997**, *51*, 1504.
12. Blanco, M.; Coello, J.; Iturriaga, H.; Maspocho, S.; Perez-Maseda, C. *Anal. Chim. Acta* **2000**, *407*, 247.



13. Blanco, M.; Valdes, D.; Bayod, M.S.; Fernandez-Mari, F.; Llorente, I. *Anal. Chim. Acta* **2004**, *502*, 221.
14. Buckton, G.; Yonemochi, E.; Hammond, J.; Moffat, A. *Int. J. Pharm.* **1998**, *168*, 231.
15. Scafi, S.H.F.; Pasquini, C. *Analyst* **2001**, *126*, 2218.
16. Roggo, Y.; Chalus, P.; Maurer, L.; Lema-Martinez, C.; Edmond, A.; Jent, N. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2007**, *44*, 683.
17. Plumb, A.P.; Rowe, R.C.; York, P.; Doherty, C. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2002**, *16*, 281.
18. Plumb, A.P.; Rowe, R.C.; York, P.; Brown, M. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2005**, *25*, 395.
19. Thissen, U.; Ustun, B.; Melssen, W.J.; Buydens, L.M.C. *Anal. Chem.* **2004**, *76*, 3099.
20. Chauchard, F.; Cogdill, R.; Roussel, S.; Roger, J.M.; Bellon-Maurel, V. *Chemometrics Intell. Lab. Syst.* **2004**, *71*, 141.
21. Buice Jr., R.G.; Gold, T.B.; Lodder, R.A.; Digenis, G.A. *Pharm. Res.* **1995**, *12*, 161.
22. Berntsson, O.; Zackrisson, G.; Ostling, G. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **1997**, *15*, 895.
23. Yang, H.; Irudayaraj, J. *J. Pharm. Pharmacol.* **2002**, *54*, 1247.
24. Freitas, M.P.; Sabadin, A.; Silva, L.M.; Gianotti, F.M.; do Couto, D.A.; Tonhi, E.; Medeiros, R.S.; Coco, G.L.; Russo, V.F.T.; Martins, J.A. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2005**, *39*, 17.
25. Li, W.Y.; Worosila, G.D.; Wang, W.; Mascaro, T. *J. Pharm. Sci.* **2005**, *94*, 2800.
26. Last, I.R.; Prebble, K.A. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **1993**, *11*, 1071.
27. Kamat, M.S.; Lodder, R.A.; DeLuca, P.P. *Pharm. Res.* **1989**, *6*, 961.
28. Cao, W.J.; Mao, C.; Chen, W.; Lin, H.; Krishnan, S.; Cauchon, N. *J. Pharm. Sci.* **2006**, *95*, 2077.
29. Bai, S.J.; Nayar, R.; Carpenter, J.F.; Manning, M.C. *J. Pharm. Sci.* **2005**, *94*, 2030.
30. Izutsu, K.I.; Fujimaki, Y.; Kuwabara, A.; Hiyama, Y.; Yomota, C.; Aoyagi, N. *J. Pharm. Sci.* **2006**, *95*, 781.
31. Savage, M.; Torres, J.; Franks, L.; Masecar, B.; Hotta, J. *Biologicals* **1998**, *26*, 119.
32. Næs, T.; Isaksson, T.; Fearn, T.; Davies, T. *A User-Friendly Guide to Multivariate Calibration and Classification*, NIR Publications: Chichester, **2002**.
33. Anderson, C.A.; Drennen, J.K.; Ciurczak, E.W. *In Handbook of Near-Infrared Analysis, Third Edition*; Burns, D.A.; Ciurczak, E.W., Ed.; CRC Press: Boca Raton, **2008**; pp. 585.
34. Frake, P.; Greenhalgh, D.; Grierson, S.M.; Hempenstall, J.M.; Rudd, D.R. *Int. J. Pharm.* **1997**, *151*, 75.
35. Rantanen, J.; Rasanen, E.; Tenhunen, J.; Kansakoski, M.; Mannermaa, J.-P.; Yliruusi, J. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2000**, *50*, 271.
36. Sukowski, L.; Ulmschneider, M. *Pharm. Ind.* **2005**, *67*, 830.
37. Brülls, M.; Folestad, S.; Spåren, A.; Rasmuson, A. *Pharmaceut. Res.* **2003**, *20*, 494.
38. Davis, T.D.; Peck, G.E.; Stowell, J.G.; Morris, K.R.; Byrn, S.R. *Pharm. Res.* **2004**, *21*, 860.
39. Hammond, S.; Warman, M. *In Abstracts of Papers: 225<sup>th</sup> ACS National Meeting*; American Chemical Society: Washington, D.C., **2003**; p. ANYL-276.
40. Cogdill, R.P.; Anderson, C.A.; Delgado-Lopez, M.; Molseed, D.; Chisholm, R.; Bolton, R.; Herkert, T.; Afán, A.M.; Drennen, J.K. *AAPS PharmSciTech* **2005**, *6*, E262.

41. Pérez-Ramos, J.D.; Findlay, W.P.; Peck, G.; Morris, K.R. *AAPS PharmSciTech* **2005**, *6*, E127.
42. Cimander, C.; Mandenius, C.-F. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **2002**, *77*, 1157.
43. Gergely, S.; Párta, L.; Salgó, A. *In Near Infrared Spectroscopy: Proceedings of the 14<sup>th</sup> International Conference*; Saranwong, S.; Kasemsumran, S.; Thanapase, W.; Williams, P., Ed.; IM Publications LLP: Chichester, **2010**; pp. 735.
44. Párta, L.; Gergely, S.; Salgó, A. *In Proceedings of the 15<sup>th</sup> International Conference on Near Infrared Spectroscopy*; Manley, M.; McGoverin, C.M.; Thomas, D.B.; Downey, G., Ed.; Cape Town, **2012**; pp. 145.
45. Navrátil, M.; Norberg, A.; Lembren, L.; Mandenius, C.-F. *J. Biotechnol.* **2005**, *115*, 67.
46. Tamburini, E.; Vaccari, G.; Tosi, S.; Trilli, A. *Appl. Spectrosc.* **2003**, *57*, 132.
47. Tosi, S.; Rossi, M.; Tamburini, E.; Vaccari, G.; Amaretti, A.; Matteuzzi, D. *Biotechnol. Prog.* **2003**, *19*, 1816.
48. Yeung, K.S.; Hoare, M.; Thornhill, N.F.; Williams, T.; Vaghjiani, J.D. *Biotechnol. Bioeng.* **1999**, *63*, 684.
49. Arnold, S.A.; Crowley, J.; Woods, N.; Harvey, L.M.; McNeil, B. *Biotechnol. Bioeng.* **2003**, *84*, 13.
50. Henriques, J.G.; Buziol, S.; Stocker, E.; Voogd, A.; Menezes, J.C. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* **2009**, *116*, 73.
51. Riley, M.R.; Rhiel, M.; Zhou, X.; Arnold, M.A.; Murhammer, D.W. *Biotechnol. Bioeng.* **1997**, *55*, 11.
52. Mandenius, C.-F.; Graumann, K.; Schultz, T.W.; Premstaller, A.; Olsson, I.-M.; Petiot, E.; Clemens, C.; Welin, M. *Biotechnol. J.* **2009**, *4*, 600.
53. Ciurczak, E.W. *In Handbook of Near-Infrared Analysis, Third Edition*; Burns, D.A.; Ciurczak, E.W., Ed.; CRC Press: Boca Raton, **2008**; pp. 581.
54. Clarke, F.C.; Jamieson, M.J.; Clark, D.A.; Hammond, S.V.; Jee, R.D.; Moffat, A.C. *Anal. Chem.* **2001**, *73*, 2213.
55. Clarke, F. *Vib. Spectrosc.* **2004**, *34*, 25.
56. Clarke, F.C.; Hammond, S.V.; Jee, R.D.; Moffat, A.C. *Appl. Spectrosc.* **2002**, *56*, 1475.
57. Lyon, R.C.; Lester, D.S.; Lewis, E.N.; Lee, E.; Yu, L.X.; Jefferson, E.H.; Hussain, A.S. *AAPS PharmSciTech.* **2002**, *3*, 1.
58. Medendorp, J.; Lodder, R.A. *J. Chemometr.* **2005**, *19*, 533.
59. Liu, J. *Pharm. Dev. Technol.* **2006**, *11*, 3.
60. Maurer, L.; Leuenberger, H. *Int. J. Pharm.* **2009**, *370*, 8.
61. Gergely, S.; Párta, L.; Salgó, A. *Magyar Kémiai Folyóirat* **2013**, *119*, 40.
62. Gendrin, C.; Roggo, Y.; Collet, C. *Talanta* **2007**, *73*, 733.
63. Gendrin, C.; Roggo, Y.; Collet, C. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2008**, *48*, 533.
64. Jamrógiewicz, M. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2012**, *66*, 1.

## 10. NMR-spektroszkópia

*Sohár Pál, ifj. Szántay Csaba, Szakács Zoltán, Sánta Zsuzsanna*

### 10.1. Az NMR-spektroszkópia alapjai

A *mágneses magrezonancia*- (NMR = nuclear magnetic resonance) spektroszkópia kísérleti megvalósítását 1946-ban publikálták (lásd a 10.1.2. fejezetben), az azóta eltelt időben az NMR egyetlen más spektroszkópiához sem hasonlítható ütemű és mértékű fejlődésen ment keresztül, aminek következtében fizikai, kémiai, biológiai, anyagtudományi, orvosi diagnosztikai, geológiai stb. elméleti és gyakorlati kutatások, technológiai fejlesztések nélkülözhetetlen eszközévé vált. A jelen tárgyalásban az NMR számtalan alkalmazása közül az oldatfázisú NMR- spektroszkópiára, mint a kémiai szerkezetkutatás egyik legfőbb eszközére szorítkozunk, elsősorban a kismolekulás (a kb. 1000 daltonnál kisebb molekulatömegű szerves vegyületek) gyógyszerkutatásokban és a gyógyszeranalitikában betöltött szerepére koncentrálnak. Célunk az, hogy bepillantást nyújtsunk az NMR-spektroszkópia alkalmazásának gyakorlati lehetőségeibe és metodikai eszköztárába. Ehhez szükség van néhány alapfogalom vázlatos ismertetésére. Az itt tárgyalt NMR-módszerek csak töredékét képezik a gyakorlatban jelenleg használtaknak. A legfontosabb mérés technikák leírásakor gyakorlati alkalmazhatóságukra, információ tartalmukra szorítkozunk. Arra törekedünk, hogy az itt nyújtott ismeretek rávilágítsanak arra, hogy milyen jellegű problémákat lehet és érdemes NMR-spektroszkópiával vizsgálni.

#### 10.1.1. Fizikai alapfogalmak\*

Ha a molekulákat elektromágneses sugárzás (fény) éri, a sugárzás frekvenciájától (energiájától, hullámhosszától) függően a sugárzás elnyelődik és a molekulák különböző kvantumállapotai gerjesztődnek. Így például a spektrum ultraibolya, illetve infravörös tartományába eső sugarak az elektronállapotok, illetve a molekularezgések gerjesztését okozzák. A fény és anyag ezen kölcsönhatásai reverzibilisek: nem okoznak változást az anyag szerkezetében.

---

\* E ponthoz a könyvtárakat megtöltő és napjainkban is rohamosan szaporodó, sok száz NMR-spektroszkópiai témájú könyv közül néhányat önkényesen kiválasztva, az elméleti alapokat elsőként részletesen tárgyaló őskiadványt<sup>1</sup> és a vegyészek számára írt néhány korszerűbb monográfiát<sup>2</sup> ajánlunk az olvasó figyelmébe.

Ha egy atom mágneses térbe kerül (amit a  $\mathbf{B}_0$  vektor reprezentál), akkor az olyan atommagokban, amelyek  $I$  spinkvantumszáma (lásd alább) nem zéró (mágneses vagy *NMR*-aktív magok), mágneses momentum ( $\boldsymbol{\mu}$ ) indukálódik, amely a tér irányához képest orientálódik, azaz különböző energiájú mágneses kvantumállapotok jönnek létre (a tér nélkül elfajult mágneses állapotok szétválnak: *Zeeman-felhasadás*). Ezen kvantumállapotok között alkalmasan megválasztott frekvenciájú (rádiófrekvenciás, RF) elektromágneses besugárzással átmeneteket idézhetünk elő. A gerjesztés hatására a mágneses momentumvektor külső mágneses térhez viszonyított iránya változik meg. Első közelítésben minden atommagfajta (izotóp) egyetlen, diszkrét frekvenciájú sugárzást nyel el, vagyis a jelenség rezonancia jellegű.

A  $\mathbf{B}_0$  mágneses térben az atommagok  $\boldsymbol{\mu}$  mágneses momentumának nagysága

$$\mu = \gamma \hbar \sqrt{I(I+1)}, \quad (10.1)$$

ahol  $\gamma$  a mag ún. giromágneses együtthatója (anyagi jellemző, minden izotópra más értéke van),  $\hbar$  a Planck-állandó,  $\hbar = h/2\pi$ ,  $I$  pedig a spinkvantumszám. Utóbbi kis egész vagy félegész szám, illetve zéró aszerint, hogy a nukleonok (protonok és neutronok) száma külön-külön is, vagy együttesen páratlan, illetve páros. Számos gyakran előforduló atommagnak nincs mágneses momentuma és nem képes az RF sugárzásból energiát felvenni. Ilyenek például a  $^{12}\text{C}$ ,  $^{16}\text{O}$  vagy a  $^{32}\text{S}$  mágnesesen inaktív atommagok. Természetesen ezeknek az elemeknek vannak (radioaktív szempontból) stabil, NMR-aktív izotópjai, például a  $^{13}\text{C}$  vagy a  $^{15}\text{N}$ .<sup>3</sup>

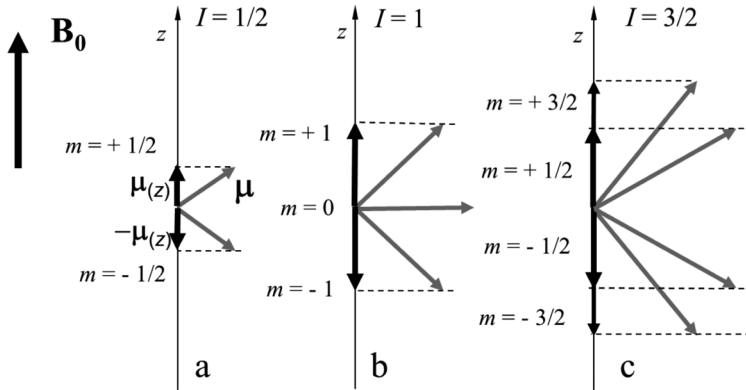
A mágneses momentum vektor a Descartes-féle koordinátarendszerben ábrázolva a  $\mathbf{B}_0$  irányához\* képest többféleképpen állhat be, de a térirányú  $\mu_{(z)}$  vetülete csak

$$\mu_{(z)} = m \gamma \hbar \quad (10.2)$$

nagyságú lehet, ahol  $m = I, I-1, I-2 \dots -I$ , összesen tehát  $(2I + 1)$ -féle értéket vehet fel. Az  $I = 1/2$  spinű magoknak (pl.  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{19}\text{F}$ ,  $^{31}\text{P}$  stb.) így két kvantumállapota van az  $m = 1/2$  és  $m = -1/2$  beállításoknak (10.1/a. ábra) megfelelően. Ha  $I = 1$  (pl.  $^{14}\text{N}$ ), akkor három kvantumállapot (10.1/b. ábra) lehetséges ( $m = 1, 0$  vagy  $-1$ ).

---

\* A  $\mathbf{B}_0$  térvektort megállapodásszerűen a  $+z$  tengellyel azonos irányúnak tekintjük. A régebbi szakirodalomban  $\mathbf{B}_0$ -t gyakran ellentétes irányúnak tüntették fel, mivel az atommagokban indukált momentum paramágneses, azaz a térrel azonos irányú, míg a már régebben ismert diamágneses momentum ellentétes irányú, s ez utóbbi vektort ábrázolták a  $+z$  tengely irányában.



10.1. ábra.  $\mu_{(z)}$  lehetséges beállásai  $I = 1/2$  (a),  $I = 1$  (b) és  $I = 3/2$  (c) spinkvantumszámú atommagokra

A kvantumállapotok energiája

$$E = -\boldsymbol{\mu} \cdot \mathbf{B}_0 = -m\gamma \hbar B_0, \quad (10.3)$$

ahol  $B_0$  a mágneses tér nagysága.

Két szomszédos kvantumállapot (amelyekre  $m$  értéke eggyel különbözik) energiakülönbsége:

$$\Delta E = \gamma \hbar B_0 = h\nu_0, \quad (10.4)$$

és ebből

$$\nu_0 = \frac{\gamma}{2\pi} B_0. \quad (10.5)$$

Ekként az a rádiófrekvencia, amellyel egy feles spinű mag alapállapotból ( $m = 1/2$ ) a nagyobb energiájú állapotba ( $m = -1/2$ ) gerjeszthető, s hasonlóképpen bármely NMR-aktív atommag egy kisebb energiájú mágneses kvantumállapotból a szomszédos nagyobb energiájú állapotba vihető át, csak  $\nu_0$  lehet. Mivel  $\gamma$  anyagi jellemző, adott  $\mathbf{B}_0$  térben minden mágneses izotóp egyedileg jellemző frekvenciájú RF sugárzást nyel el. Az RF sugárzásnak e szelektív abszorpciója okozza a jelenség rezonancia jellegét. A térerő nagyságával egyenes arányban változnak a rezonanciafrekvenciák is (10.1. táblázat). A jelenlegi gyakorlatban a  $\mathbf{B}_0$  teret szupravezető mágnesekkel állítják elő, amelyek térejeje 4,7-23,5 tesla, ami a proton 200 MHz, illetve 1 GHz rezonanciafrekvenciájának felel meg.

10.1. táblázat. A fontosabb izotópok NMR-paramétereir<sup>3</sup> a ma elterjedt spektrométereket jellemző két térerőnél

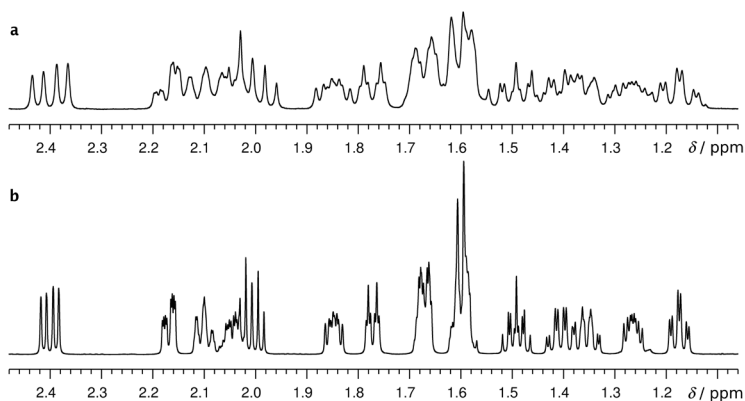
Izotóp	Spin- kvantum- szám	Természetes előfordulási gyakoriság /%	Relatív NMR- érzékenység	Rezonanciafrekvencia /MHz	
				7,05 T	11,75 T
<sup>1</sup> H	½	99,99	1	300,1	500,1
<sup>2</sup> H	1	0,0115	9,65·10 <sup>-3</sup>	46,1	76,8
<sup>3</sup> H	½	0 (radioaktív)	1,21	320,1	533,4
<sup>7</sup> Li	3/2	92,41	0,293	44,2	73,6
<sup>10</sup> B	3	19,9	1,99·10 <sup>-2</sup>	32,2	53,7
<sup>11</sup> B	3/2	80,1	0,165	96,3	160,5
<sup>12</sup> C	0	98,93	0	–	–
<sup>13</sup> C	½	1,07	1,59·10 <sup>-2</sup>	75,5	125,8
<sup>14</sup> N	1	99,64	1,00·10 <sup>-3</sup>	21,7	36,1
<sup>15</sup> N	½	0,36	1,04·10 <sup>-3</sup>	30,4	50,7
<sup>16</sup> O	0	99,96	0	–	–
<sup>17</sup> O	5/2	0,038	2,92·10 <sup>-2</sup>	40,7	67,8
<sup>19</sup> F	½	100	0,83	282,4	470,6
<sup>29</sup> Si	½	4,69	7,86·10 <sup>-3</sup>	59,6	99,4
<sup>31</sup> P	½	100	6,65·10 <sup>-2</sup>	121,5	202,4

A 10.1. táblázatban szereplő magok közül a szerves gyógyszerkémiai alkalmazások szempontjából a <sup>1</sup>H, a <sup>13</sup>C, a <sup>15</sup>N, a <sup>19</sup>F és a <sup>31</sup>P a legfontosabbak. Ezek az atommagok mind feles spinűek, azaz a **B**<sub>0</sub> térben két kvantumállapotuk van. E magok kiemelt fontosságára való tekintettel, valamint az egyszerűség kedvéért, további tárgyalásunkat az ½ spinű magokra korlátozzuk.

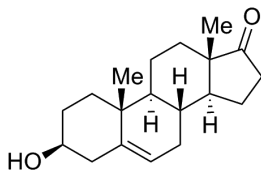
A 10.1/a. ábra szerint a **B**<sub>0</sub> térben az ½ spinű atommagok mágneses momentumának két eltérő kvantumállapota lehet, ami a (10.3) egyenlet alapján két eltérő energianívónak felel meg. A nagyobb energiájú nívót β-val, a kisebb energiáját α-val jelölve, a β-spineeknek a mágneses momentum negatív  $-\mu_{(z)}$  értéke (térrel ellentétes irányú beállása) felel meg, míg az α-spinekekhez  $+\mu_{(z)}$ , azaz térirányú vetület tartozik.

A kvantumállapotok energiája csak rendkívül kismértékben tér el. Például a víz hidrogénjeinek két mágneses állapota van (a spin ½), s ha gerjesztett állapotba 10<sup>7</sup> H-atom kerül, akkor szobahőmérsékleten

alapállapotban mindössze 66 maggal van több. Ez a roppant kicsiny betöltöttségkülönbség ( $n_e$ ) a gerjesztés hatására igen gyorsan kiegyenlítődik, s akkor további energiafelvétel már nem lehetséges, a rendszer *telítődik*. A rezonanciaabszorpció (a rezonanciajel) folyamatosan csak akkor megfigyelhető, ha nincs telítés. Az NMR-spektroszkópia „gyenge pontja” tehát, hogy a kvantumállapotok  $\Delta E$  energiakülönbsége, s ezért a kvantumállapotok benépesültségkülönbsége is rendkívül kicsi. A populációkülönbség közel lineárisan nő a  $B_0$  térerővel [lásd alább a (10.6) egyenletet]. Ezért az NMR-spektroszkópia rohamos fejlődésének egyik kulcskérdése a  $B_0$  térerő növelése volt, ami egyúttal a spektrális felbontás növekedésének előnyét is magában hordozza, hiszen (10.5) alapján a térerő növelésével a rezonanciafrekvenciák egymástól való távolsága is lineárisan nő. Amellett, hogy ez a jelek kedvező szeparációját segíti, a 10.1.3. pontban tárgyalt okokból egyúttal a nem elsőrendű spinrendszereket is egyszerűsíti, ezzel jelentősen megkönnyítve a spektrum interpretációját. A  $B_0$  térerő növelésének jelentőségét a felbontás javítása szempontjából a 10.2. ábra szemlélteti.



10.2. ábra. A dehidroepiandroszteron (**1**)  $^1\text{H}$  NMR-spektrum részlete 400 (a), illetve 800 MHz-es (b) készüléken mérve



**1**

Képzeljünk el ezek után egy  $\frac{1}{2}$  spinű atommagsokaságot, amelyben minden atom egyforma kémiai közegben van. Ilyen például egy kb. fél ml-nyi vízből álló minta, ami nagyságrendileg  $10^{22}$  számú hidrogénatomot



tartalmaz. Ha ez a minta  $\mathbf{B}_0$  térbe kerül, akkor a tér hatására a két energianívó (10.4)-nek megfelelően pillanatszerűen szétválik, de ekkor még mindkét energianívón azonos  $N_\alpha$  és  $N_\beta$  számú mag van. A (10.6) összefüggéssel leírt Boltzmann-törvény megszabta hőmérsékleti egyensúlyban azonban az alacsonyabb energiaállapotú magok száma nagyobb kell, hogy legyen, mint a magasabb energiájúaké ( $N_\alpha > N_\beta$ ):

$$\frac{N_\alpha}{N_\beta} = e^{\frac{\Delta E}{kT}} = e^{-\frac{\gamma \hbar B_0}{kT}} \approx 1 - \frac{\gamma \hbar B_0}{kT}. \quad (10.6)$$

A (10.6) egyenlet szerinti egyensúly időfolyamatként alakul ki, amelynek során egyes magok a felső energianívóról az alsó nivóra kerülnek ( $E_\beta \rightarrow E_\alpha$ ), miközben parányi hő formájában energiát adnak le az ún. „rács”-nak (ami alatt a környezetet, az oldatfázisban hőmozgást végző molekulákat értjük), mások viszont a rácsból energiát felvéve alapállapotból gerjesztettbe kerülnek ( $E_\alpha \rightarrow E_\beta$ ). Az  $\alpha \rightarrow \beta$  átmenetek valószínűségét a  $W_{\alpha \rightarrow \beta}$  valószínűségi állandó jellemzi, ami megadja, hogy egységnyi számú  $\alpha$  spinre vonatkoztatva egységnyi idő alatt hány  $\alpha \rightarrow \beta$  átmenet történik. Hasonlóan, a  $W_{\beta \rightarrow \alpha}$  valószínűségi állandó megadja egységnyi számú  $\beta$  spinre az egységnyi idő alatt végbemenő  $\beta \rightarrow \alpha$  átmenetek számát. Adott pillanatban tehát az  $\alpha \rightarrow \beta$  irányban egységnyi idő alatt állapotot váltó összes spin száma (vagyis a spinek  $\alpha \rightarrow \beta$  irányú „anyagárama”)  $N_\alpha W_{\alpha \rightarrow \beta}$ ; hasonlóképpen, a  $\beta \rightarrow \alpha$  „anyagáram”  $N_\beta W_{\beta \rightarrow \alpha}$ . A spin-rács kölcsönhatás során (itt nem tárgyalt statisztikus fizikai okokból) a  $\beta \rightarrow \alpha$  átmeneteknek valamivel nagyobb a valószínűsége, mint az  $\alpha \rightarrow \beta$  átmenetekének, vagyis  $W_{\beta \rightarrow \alpha} > W_{\alpha \rightarrow \beta}$ . Miután egyensúly esetén  $N_\alpha W_{\alpha \rightarrow \beta} = N_\beta W_{\beta \rightarrow \alpha}$ , a  $W_{\beta \rightarrow \alpha} > W_{\alpha \rightarrow \beta}$  feltételből az következik, hogy  $N_\alpha > N_\beta$ , így alakul ki egyensúlyban az alsó energianívó populációjának (10.6) szerinti többlete. Azt a folyamatot, amelyben az egyensúlyi Boltzmann-eloszlás kialakul, *spin-rács relaxációnak* nevezzük. A relaxáció folyamatát az alábbi összefüggés írja le:

$$n_e - n = (n_e - n_0) \cdot e^{-\frac{t}{T_1}}, \quad (10.7)$$

ahol  $n = N_\alpha - N_\beta$ , azaz a betöltöttségkülönbség pillanatnyi értéke,  $n_e$  az egyensúlyi és  $n_0$  a kezdeti betöltöttségkülönbség,  $T_1$  pedig a *spin-rács relaxációs idő* (az az idő, amely alatt  $n_e$  és  $n$  kezdeti különbsége  $e$ -ed részére csökken), ami a spineknek egy adott kvantumállapotban eltöltött átlagélettartamát jelenti. A gyógyszerkémiában jellemzően előforduló kis szerves molekuláknál nemviszkózus oldatokban a  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$ ,  $^{19}\text{F}$  és  $^{31}\text{P}$  magok  $T_1$  értékei a 0,1-10 másodperces nagyságrendbe esnek, de ritkábban előfordulnak ennél rövidebb, illetve hosszabb értékek is.



A Boltzmann-egyensúly beálltával  $N_\alpha > N_\beta$ , és ez azt jelenti (vö. 10.1/a. ábra), hogy több olyan spin van, amelyhez a  $\mathbf{B}_0$  irányú  $\boldsymbol{\mu}_{(z)}$  vektor tartozik, mint olyan, amelynek  $\boldsymbol{\mu}_{(z)}$  komponense a  $\mathbf{B}_0$  irányával ellentétes. Ebből következik, hogy a koordináta-rendszerben a  $\boldsymbol{\mu}_{(z)}$  vektorok  $\sum \boldsymbol{\mu}_{(z)}$  eredőjeként  $\mathbf{B}_0$  irányú egyensúlyi *makroszkopikus*  $\mathbf{M}_e$  *mágnesezettség* alakul ki.

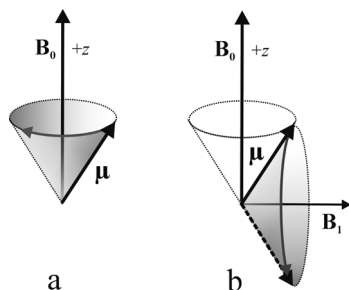
Az  $\mathbf{M}_e$  mágnesezettség kialakulását úgy is jellemezhetjük, hogy a  $\mathbf{B}_0$  tér bizonyos mértékig a saját irányába polarizálja a spineket (ezért a  $\mathbf{B}_0$  teret *polarizáló térnek* is szokás nevezni). Az  $\mathbf{M}_e$  mágnesezettség  $z$  iránya azt jelenti, hogy a „transzverzális”  $(x,y)$  síkban nincsen polarizáló tér, a mágneses momentumoknak az  $(x,y)$  síkba eső  $\mu_{(x,y)}$  komponensei ebben a síkban véletlenszerűen vannak szétszóródva, azaz  $\sum \boldsymbol{\mu}_{(x,y)}$  vektori eredőjük zérus.

Az  $\mathbf{M}_e$  makroszkopikus mágnesezettség nagysága ( $M_e$ ) az  $n_e$  egyensúlyi populációkülönbséggel arányos. Az egyensúlyi makroszkopikus mágnesezettség tehát az alábbi módon írható le:

$$\sum \boldsymbol{\mu}_{(z)} = \mathbf{M}_e; \quad \sum \boldsymbol{\mu}_{(x,y)} = \mathbf{0}; \quad M_e \sim n_e = N_\alpha - N_\beta. \quad (10.8)$$

A fentiek szerint általános esetben az  $\mathbf{M}$  mágnesezettség  $z$  irányú komponensének nagysága arányos a Zeeman-nívók betöltöttségének különbségével, azaz  $M_{(z)} \sim n$ .

A klasszikus fizika szerint a mágneses mező forgatónyomatékokot ( $\boldsymbol{\mu} \times \mathbf{B}$ ) fejt ki a belé kerülő mágneses momentummal rendelkező testekre. Ha a testnek van  $\boldsymbol{\mu}$  vektor irányú impulzusmomentuma (perdülete), akkor a  $\boldsymbol{\mu}$  vektor a rá ható forgatónyomaték irányába mozdul el. Ez áll fenn az NMR-aktív atommagok esetében: ezen magoknak *saját* impulzusmomentuma (spinje) van, amellyel arányos a mágneses momentumuk. Az arányossági tényező  $\gamma$ , a mag giromágneses hányadosa. Eszerint az atommagok forgó testnek tekinthetők, melyek forgástengelye a rájuk forgatónyomatékok kifejtő erőterben – a newtoni mechanika törvényei alapján – egy kúppalást felületén további forgó mozgást végez. E forgómozgás szögsebessége  $\omega_0 = \gamma B_0$ . E *Larmor-precesszió*nak nevezett mozgás (10.3/a. ábra)  $\omega_0/2\pi = \nu_0$  frekvenciája (Larmor-frekvencia) azonos a  $\nu_0$  frekvenciával, amellyel (10.5) alapján az atommagok kvantumállapotai közötti átmenetek gerjeszthetők. A spinek gerjesztését, azaz a rezonanciajelenség előidézését a rádiófrekvenciás besugárzás alternáló  $\mathbf{B}_1(t)$  komponensével érhetjük el: amennyiben a homogén  $\mathbf{B}_0$  tér mellett egy  $\omega_0$  szögsebességgel forgó,  $\mathbf{B}_0$ -ra merőleges  $\mathbf{B}_1(t)$  tér is hat a rendszerre, az maga körüli precesszióra készítheti a spineket (10.3/b. ábra).



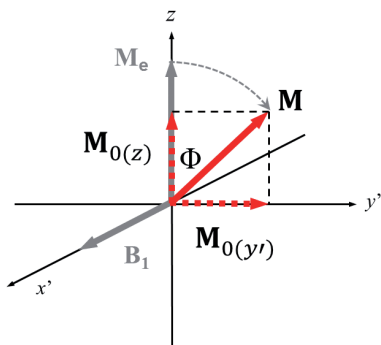
10.3. ábra. A  $\mu$  momentum precessziója a  $\mathbf{B}_0$  és  $\mathbf{B}_1$  térben

Az NMR-spektroszkópia elméletének és gyakorlatának egyik leglényegesebb vonása az, hogy a spinek gerjesztése igen sokféle módon megvalósítható attól függően, hogy milyen molekulaszervezeti információra van szükségünk. Az NMR-spektroszkópiai kutatások egyik igen fontos területe az új gerjesztési technikák kidolgozása. Az alábbiakban három elemi gerjesztési módot említünk: A) „kemény” pulzus; B) „lágý” pulzus; C) folyamatos gerjesztés.

A) A „kemény” pulzus esetében egy rövid, mindössze néhány  $\mu\text{s}$  hosszú monokromatikus RF besugárzást (pulzust) alkalmazunk. A kemény pulzus időben négyszög alakú, vagyis állandó  $B_1$  amplitúdójú, ami azt jelenti, hogy teljesítménye zérusról pillanatszerűen változik a  $B_1$  értékre, néhány  $\mu\text{s}$ -ig ezen az értéken marad, azután pillanatszerűen visszaesik zérusra. A pulzust úgy állítjuk elő, hogy annak  $\mathbf{B}_1(t)$  komponense az  $(x,y)$  síkban, közelítőleg a spinek Larmor-frekvenciájával, a precesszióval azonos irányban forogjon. A „kemény” szó arra utal, hogy a pulzus nagy energiájú, vagyis a  $B_1$  értéke meglehetősen nagy.

A pulzusgerjesztés lényegét a fentebb említett vízminta  $\mathbf{M}_e$  makroszkopikus mágnesezettségre gyakorolt hatása szemlélteti. Az egyedi  $\mu$  mágnesezettségekhez hasonlóan az  $\mathbf{M}$  makroszkopikus mágnesezettségre is (általános esetben) a  $\mathbf{B}$  térben  $\mathbf{M} \times \mathbf{B}$  forgatónyomaték hat,  $\mathbf{M}$  pedig mindenkor ennek irányába mozdul el. Ha a pulzus frekvenciája a spinek rezonanciafrekvenciájának közelében van, akkor az  $\mathbf{M}_e$  mágnesezettség az  $\mathbf{M}_e \times \mathbf{B}_1$  forgatónyomaték hatására a  $\mathbf{B}_1$  körül precesszál, tehát „kibillen” a  $+z$  irányból. A pulzus mindössze annyi ideig kell, hogy hasson, hogy a kibillentett mágnesezettség megfelelő nagyságú  $\mathbf{M}_{(x,y)}$  komponens adjon az  $(x,y)$  síkban. A pulzusnak ez a hatása könnyen megérthető, ha gondolatban „belehelyezkedünk” egy olyan  $(x',y',z)$  koordináta-rendszerbe, ami a  $z$  tengely körül együtt forog a  $\mathbf{B}_1$  vektorral, ami ebben a rendszerben tehát statikus. Ha a  $\mathbf{B}_1$  pulzust az  $x'$  tengely

mentén képzeljük el, akkor az az  $\mathbf{M}_e \times \mathbf{B}_1$  forgatónyomaték okán az  $y'$  tengely irányába billenti a mágnesezettséget (10.4. ábra).



10.4. ábra. Pulzusgerjesztés hatása a makroszkopikus mágnesezettségre forgó koordinátarendszerben

A pulzus hossza a kibillentés  $\Phi$  szögével jellemezhető. Ha a pulzus a mágnesezettséget az  $(x,y)$  síkig billenti, azaz  $\Phi = 90^\circ$ , akkor „ $90^\circ$ -os pulzus”-ról beszélünk. Fontos leszögezni, hogy a néhány mikroszekundumig tartó pulzus ideje alatt a relaxáció hatása általában elhanyagolható. Ezt figyelembe véve, a kibillentett  $\mathbf{M}$  mágnesezettség a pulzus kikapcsolását követő  $t = 0$  pillanatban két vonatkozásban is nemegyensúlyi állapotban van a (10.8) szerinti állapothoz képest: egyrészt  $z$  irányú komponensének  $M_{0(z)}$  abszolút értéke kisebb, mint az  $M_e$  termikus-egyensúlyi érték, másrészt viszont az  $(x,y)$  síkba eső  $M_{0(x,y)}$  komponense nem zérus. Így tehát a pulzust követően (azaz  $\mathbf{B}_1$  kikapcsolása után) a kibillentett  $\mathbf{M}$  mágnesezettség három jellegzetes folyamatban változik:

(a)  $\mathbf{M}$  a  $\mathbf{B}_0$  tér körül a 10.3/a. ábrával analóg módon az  $\mathbf{M} \times \mathbf{B}_0$  forgatónyomaték hatására  $\nu_0$  frekvenciájú Larmor-precessziót végez az  $(x,y,z)$  rendszerben;

(b) a spin-rács kölcsönhatás eredményeként az  $\mathbf{M}$  mágnesezettség  $M_{(z)}$  komponense visszatér (relaxál) eredeti  $M_e$  értékéhez. Tekintve, hogy  $M_{(z)} \sim n$ , (10.7) egyenlet analógiájára ez a folyamat az alábbiak szerint írható le:

$$M_e - M_{(z)} = (M_e - M_{0(z)}) \cdot e^{-\frac{t}{T_1}}; \quad (10.9)$$

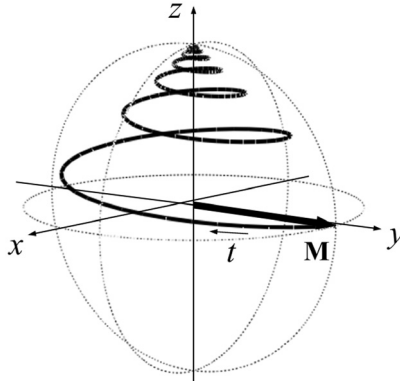
(c) a mágnesezettség  $(x,y)$  síkbeli komponense a (10.10) összefüggés szerinti exponenciális lecsengéssel zérushoz tart:

$$M_{(x,y)} = M_{0(x,y)} \cdot e^{-\frac{t}{T_2}}. \quad (10.10)$$

Ez utóbbi folyamat részben az egymáshoz közeli spinpárok energiacseréjéből származik, ezért *spin-spin relaxációnak*, a  $T_2$  időállandót pedig *spin-spin relaxációs időnek* is szokás nevezni.

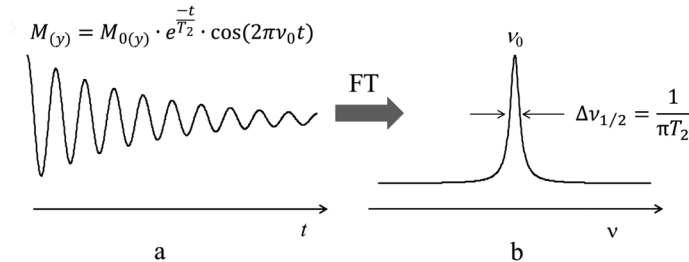
A mágnesezettségnek e folyamatok együttes hatására végbemenő változását kvalitatíve a 10.5. ábra mutatja egy  $90^\circ$ -os pulzust követően.

Ha a 10.5. ábrán látható „csigavonal”  $(x,y)$ -síkbeli vetületét az idő függvényében ábrázoljuk, akkor egy  $T_2$  időállandóval exponenciálisan csillapított harmonikus oszcillációt kapunk. Az  $M_{(y)}$  komponens időbeli lecsengését pl. a 10.6/a. ábrán bemutatott függvény szemlélteti.



10.5. ábra.  $\mathbf{M}$  vektor időbeli változása egy  $90^\circ$ -os pulzust követően

Ha az  $(x,y)$  síkban elhelyezünk egy rádiófrekvenciás vevőtekercset, akkor az  $(x,y)$  síkban alternáló mágnesezettség, Faraday indukciós törvénye alapján, ebben a tekercsben váltakozó feszültséget generál (dinamóelv), amelynek időbeli alakja megfelel a 10.6/a. ábra szerint csillapodó oszcillációnak. A vevőben az így mért időbeli jel a „*free induction decay*” (FID), ahol a „free” és „decay” szavak arra utalnak, hogy a pulzust követően az  $\mathbf{M}$  mágnesezettség a  $\mathbf{B}_0$  térben szabadon (értsd: gerjesztő tér nélkül) relaxál vissza egyensúlyi állapotába, vagyis az  $M_{(x,y)}$  komponens szabadon tűnik el, „cseng le”; míg az „induction” szó



10.6. ábra. Detektált jel (FID) és spektrum

a makroszkopikus mágnesezettség által a vevőtekericsben indukált feszültséget jelenti. A spektrumot a FID Fourier-transzformációjával (FT) kapjuk, ami az időbeli jelet a szokásos frekvenciadimenziójú rezonanciajellé alakítja (10.6/b. ábra). A FID exponenciális lecsengéséből adódóan a rezonanciajelet az ún. Lorentz-függvény írja le, amelynek maximuma éppen a  $\nu_0$  Larmor-frekvenciánál van,  $\Delta\nu_{1/2}$  félértékszélessége (vagyis a jel csúcsmagasságának felénél mért szélessége) pedig  $T_2$ -vel fordítva arányos:

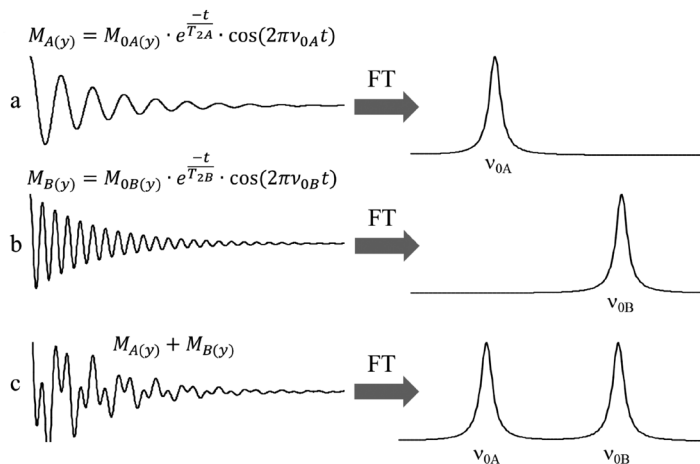
$$\Delta\nu_{1/2} = \frac{1}{\pi T_2}. \quad (10.11)$$

Fontos figyelembe venni, hogy  $T_1$  és  $T_2$  rendkívül érzékeny a vizsgálati körülményekre. Híg oldatokban, kis viszkozitásoknál  $T_2$  általában összemérhető  $T_1$ -gyel, de a gyakorlatban annál valamivel kisebb. Minden olyan körülmény, ami rövidíti a  $T_1$  spin-rács relaxációs időt, egyúttal rövidíti  $T_2$  értékét is, ezzel jelszélesedést okozva. Ugyanakkor  $T_2$  rövidülhet anélkül is, hogy  $T_1$  változna, aminek általában a legfőbb oka az, hogy a gyakorlatban lehetetlen tökéletesen homogén  $B_0$  teret előállítani, a tér inhomogenitásai pedig tovább rövidítik  $T_2$  értékét. A gyakorlatban igyekezni kell olyan kísérleti körülményekről gondoskodni, amelyek a lehető leghosszabb  $T_2$ -értékeket biztosítják, hiszen minél élesebbek a jelek, annál nagyobb a spektrális felbontás és annál jobb a jel/zaj viszony is (lásd alább).

A kemény pulzussal való gerjesztés jelentősége az NMR-spektroszkópia gyakorlatában belátható az alábbiakban két szempontot figyelembe véve.

1) Nagy energiájánál fogva az RF pulzus képes a makroszkopikus mágnesezettséget a 10.4. ábrán bemutatott módon kibillenteni, még akkor is, ha a pulzus frekvenciája nem pontosan egyezik meg a mágnesezettség Larmor-frekvenciájával. E tény jelentősége belátható a következőkből. Eddig az elképzelt vízminta kapcsán egy olyan spin-sokaság viselkedését tárgyaltuk, ami azonos Larmor-frekvenciájú spinekből áll. A szerkezetkutatási szempontból érdekes szerves molekulákban vagy különböző molekulákat tartalmazó elegyekben egy adott NMR-aktív magfajtából több különböző Larmor-frekvenciájú spin van (ld. 10.1.2. pont), ezért az NMR-spektrumban több rezonanciajel van. Pl. a dimetil-éter és acetone 1:1 molarányú elegyből készített oldatban, a  $B_0$  térben a dimetil-éter összes protonja  $\nu_{0A}$ , az acetone valamennyi protonja pedig  $\nu_{0B}$  frekvenciával precesszál, azonban a 10.1.2. pontban tárgyalt okokból  $\nu_{0A}$  és  $\nu_{0B}$  eltérnek egymástól. Miután a mintában nagyszámú dimetil-éter és acetone molekula van, mindkettő létrehozza a saját  $\mathbf{M}_{eA}$ , illetve  $\mathbf{M}_{eB}$

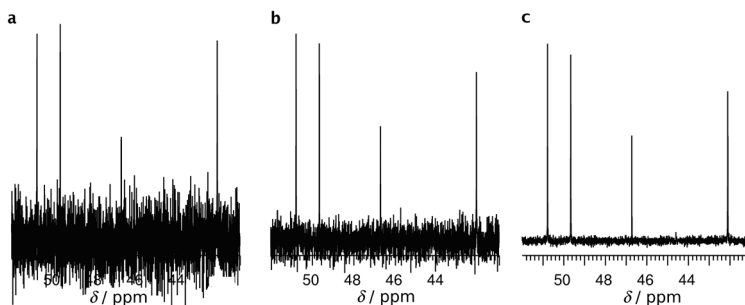
makroszkopikus mágnesezettségét. A pulzusgerjesztés módot ad arra, hogy egyetlen olyan pulzussal, amelynek a frekvenciája  $\nu_{0A}$  és  $\nu_{0B}$  közelébe esik, *egyszerre* billentsük ki az  $M_{eA}$  és  $M_{eB}$  mágnesezettségeket. Ebben az esetben a pulzust követően detektált FID (10.7/c. ábra) az egyedi FID-ek (10.7/a. és 10.7/b. ábra) szuperpozíciója. A 10.6. ábrával analóg módon, a detektált FID Fourier-transzformációjával kapott spektrum mindkét vegyület rezonanciajelét tartalmazza, tehát egyetlen mérésből megkapható  $\nu_{0A}$  és  $\nu_{0B}$  értéke (10.7. ábra).



10.7. ábra. Két különböző frekvenciájú FID szuperpozíciójaként kialakuló jel, és annak Fourier-transzformáltja

2) Más spektroszkópai módszerekkel összehasonlítva az NMR rendkívül érzéketlen módszer, vagyis a detektált rezonanciajel a spektrométer elektronikus zajához mérten viszonylag kicsi, ami kedvezőtlen jel/zaj („signal-to-noise”, S/N) viszonyt eredményez. A jel/zaj viszony növelésének egyik rutinszerűen alkalmazott módja az akkumuláció (CAT: *computer averaged transients*). Miután a zaj véletlenszerűen (random) változik, viszont a rezonanciajel mindig ugyanannál a frekvenciánál jelenik meg, ha sok egymást követő mérés során kapott spektrumot összeadunk (akkumulálunk), akkor a jel/zaj viszony növelhető. A pulzusgerjesztés kényelmes módot ad erre, miután egyetlen pulzus, az azt követő relaxációs idővel együtt, mindössze néhány másodpercig tart. Megmutatható, hogy a jel/zaj viszony a pulzusok számának négyzetgyökével emelkedik, vagyis  $S/N \sim \sqrt{\text{pulzusszám}}$ . Az akkumuláció hatását a 10.8. ábra illusztrálja a dehidroepiandroszteron (**1**) 100 MHz-es  $^{13}\text{C}$  NMR-spektrumának részletén. [A jel/zaj viszony növelésére egyéb technikai lehetőségek is léteznek (ld. 10.2.2. pont)].

B) A „lágý” pulzus esetében, amint azt a neve is sugallja, a kemény pulzushoz képest jóval kisebb  $B_1$ -értékeket alkalmazunk, és a pulzus ideje is hosszabb, általában néhányszor tíz milliszekundum (ez még mindig igen rövid a tipikus  $T_1$  és  $T_2$  időkhöz képest). A lágý pulzusokkal szűkebb frekvenciatartományt vagy akár egyetlen kiválasztott jelet gerjeszthetünk. A lágý pulzusokra jellemző, hogy időprofiljuk igen változatos lehet – ezek az ún. *formázott* („tailored”, azaz a négyszögjelnél bonyolultabb időbeli lefutású) pulzusok. A formázott lágý pulzusokkal a legkülönbözőbb módon lehet a spineket gerjeszteni, s ennek igen nagy a gyakorlati jelentősége pl. az ún. szelektív mérési technikák esetében (ld. 10.3.2. fejezet).



10.8. ábra. Az akkumuláció hatása a spektrum jel/zaj viszonyára  
(a) 16, (b) 64 és (c) 1024 pulzus után. S/N: (a) 5,1; (b) 10,6 és (c) 45,3

C) A *folyamatos* (continuous wave, CW) gerjesztéskor konstans frekvenciájú, gyenge és konstans  $B_1$  intenzitású RF besugárzást alkalmazunk, a legegyszerűbb esetben azzal a céllal, hogy egy adott Larmor-frekvenciájú spin-sokaság makroszkopikus mágnesezettségét szelektíven „telítsük”, azaz jelintenzitását erősen csökkentsük anélkül, hogy a spektrum egyéb jelei változnának. Ez például akkor lehet szükséges, ha a spektrumban egy erős oldószerjel eltakarja a gyengébb jeleket, ezért az oldószer jelét „el kell nyomni”; továbbá ezt a típusú gerjesztést gyakran használják bizonyos, téren át ható spin-spin kölcsönhatások mérésekor is, vagy cserefolyamatok tanulmányozásakor (ld. 10.1.8. és 10.1.9. pont). A „folyamatos” szó alatt azt kell érteni, hogy a besugárzást a  $T_1$  időskálával összemérhető ideig (a  $T_1$  idő néhányszorosáig) tartjuk fenn.

A telítés fent említett jelensége első közelítésben a kvantummechanika segítségével értelmezhető. Bizonyítható ugyanis, hogy ha a relaxáció hatásával nem számolunk, akkor a rezonanciafrekvencián történő folyamatos RF besugárzás esetén a gerjesztő tér egyforma valószínűséggel indukálja a  $\beta \rightarrow \alpha$  és az  $\alpha \rightarrow \beta$  átmeneteket, azaz  $W_{\beta \rightarrow \alpha} = W_{\alpha \rightarrow \beta}$ . Miután a gerjesztés megkezdése előtt  $N_\alpha > N_\beta$ , ez azt jelenti, hogy az RF besugárzás



bekapcsolásakor a kezdeti „gerjesztő anyagáram” nagyobb, mint az „emissziós”, azaz  $N_\alpha W_{\alpha \rightarrow \beta} > N_\beta W_{\beta \rightarrow \alpha}$ ; ez az „anyagáram”-beli különbség teszi lehetővé az NMR-jel mérését. A folyamatos RF besugárzás hatására azonban, egy tranziens szakasz után, kialakul az  $N_\alpha W_{\alpha \rightarrow \beta} = N_\beta W_{\beta \rightarrow \alpha}$  egyensúly, ami a  $W_{\beta \rightarrow \alpha} = W_{\alpha \rightarrow \beta}$  feltétellel azt jelenti, hogy  $N_\alpha = N_\beta$ , vagyis az alsó és felső nivó populációja azonosává válik – a spinrendszer telített állapotba jut. Telítéskor  $N_\alpha W_{\alpha \rightarrow \beta} = N_\beta W_{\beta \rightarrow \alpha}$ , azaz megszűnik az a nettó „anyagáram”, ami a mérhető NMR rezonanciajelet adja. Ha azonban  $N_\alpha = N_\beta$ , akkor (10.8) összefüggés alapján az egyensúlyi makroszkopikus mágnesezettség zérus. Tehát ha a szelektív telítést követően egy kemény pulzust alkalmazunk, akkor a telített mágnesezettség jele eltűnik a spektrumból. A gyakorlatban azonban a folyamatos besugárzás ideje alatt a spin-rács relaxáció hatása is érvényesül, amely igyekszik az  $N_\alpha > N_\beta$  állapotot fenntartani. A telítődés tényleges mértéke tehát attól függ, hogy a folyamatos RF besugárzás milyen mértékben képes kompenzálni a relaxáció hatását. A gyakorlatban előforduló tipikus relaxációs idők mellett (lásd fent) általában meglehetősen nagymértékű telítést lehet elérni.

A telítés jelenségének egyik fontos gyakorlati felhasználása pl. az ún. „oldószer elnyomás”. Bizonyos esetekben (pl. híg vizes oldatokban, ld. 10.4.3. fejezet) a spektrumban igen intenzív lehet az oldószer rezonanciajele a mérendő anyag jeleihez képest, amely elfedhet értékes spektrumtartományokat. Az oldószer jelének „elnyomásával”, amit a legegyszerűbb esetben egy megfelelően szelektív CW besugárzással érhetünk el, az oldószer jelét „eltüntethetjük” a spektrumból.

A fentebb vázolt pulzusüzemű és folyamatos gerjesztési módok egymással kombinálva is alkalmazhatók, aminek igen nagy a gyakorlati jelentősége. A részben kémiai kötésekben keresztül, részben közvetlenül téren át létrejövő spin-spin kölcsönhatások feltérképezése rendkívül gazdag és pontos információt ad a molekula szerkezetéről. Az ilyen kölcsönhatások kísérleti mérése azonban nem egyszerű, és a spinek bonyolult módokon való gerjesztését igényli annak érdekében, hogy megfelelően detektálhatók legyenek. Ehhez a különböző gerjesztési módok szekvenciális használata szükséges oly módon, hogy adott típusú kölcsönhatás detektálása érdekében különböző irányokból (azaz különböző fázisokkal), különböző hosszúságú és intenzitású pulzusok megfelelően időzített sorozatát alkalmazzuk, ezzel előre tervezetten „manipulálva” a spineket. A pulzusszekvenciák végén tipikusan egy  $90^\circ$ -os „elemző” kemény pulzussal (read pulse) tesszük mérhetővé a „spin-manipuláció” végeredményét. A modern NMR-spektroszkópia gyakorlata nagyrészt az ilyen *pulzusszekvenciák* alkalmazásán alapul (ezekből több száz ismeretes a



szakirodalomban),<sup>4</sup> és fejlesztésük az NMR-spektroszkópia önálló kutatási területét képezi. A pulzusszekvenciák segítségével nem csak a szokásos *egydimenziós* (1D) NMR-spektrumok számos fajtája mérhető, hanem a legkülönbözőbb *kétdimenziós* (2D) NMR-spektrumok is (ld. 10.3.3. pont). [Az „egydimenziós” jelző az olyan spektrumokra utal, amelyek vízszintes tengelyén a frekvencia (vagy legtöbbször a ppm-ben kifejezett „kémiai eltolódás”), a függőleges tengelyén pedig a rezonanciajelek intenzitása van feltüntetve. A „kétdimenziós” kifejezés pedig olyan spektrumokat jelent, amelyeknek mind a vízszintes, mind pedig a függőleges tengelyén egy-egy spektrumot ábrázolunk, e két tengely által kifeszített síkra merőlegesen pedig egy olyan „domborzati képet” kapunk, amelyből kiolvashatók a különféle spin-spin kölcsönhatások].

A legfontosabb pulzusszekvenciákon alapuló mérések gyakorlati használatát a 10.3.3. pont tárgyalja.

### 10.1.2. A kémiai eltolódás

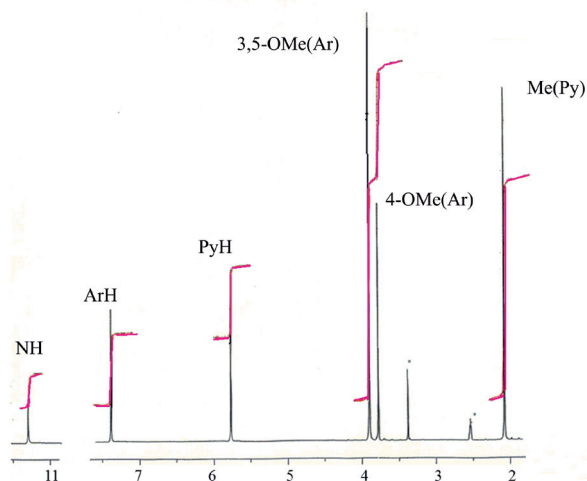
Az első sikeres rezonanciakísérletet 1945-ben a Bloch és Purcell vezette kutatócsoportok egymástól függetlenül hajtották végre a víz, illetve a paraffin H-magjain, ezért később megosztott Nobel-díjat kaptak. A kémia számára azonban az NMR-módszer csak az 1950-es évek kezdetétől vált érdekessé. Ekkor derült ki ugyanis, hogy a  $\nu_0$  Larmor-frekvencia molekuláris környezetben – bár csak igen kis mértékben – megváltozik, és a (10.5) egyenlet szerinti érték csak a molekuláris környezetből kiemelt „csupasz” magokra érvényes. Ennek oka a molekulákban az atommagokat körülvevő mozgó elektronok keltette  $\mathbf{B}_L$  lokális mágneses tér, ami a külső  $\mathbf{B}_0$  térrel ellentétes irányú. Így az atommagok által ténylegesen érzékelt  $B'_0$  mágneses tér nagysága  $B'_0 = B_0 - B_L$  (ahol természetesen  $B_L$  elenyészően kicsi  $B_0$ -hoz képest), és – a (10.5) összefüggés értelmében – a valós rezonanciafrekvencia  $\nu_0$  helyett  $\nu_0 = (\gamma / 2\pi)(B_0 - B_L) = (\gamma / 2\pi)B'_0$ .

A különböző kémiai környezetben lévő magok körül különböző lokális terek létesülnek, s ezért ugyanaz a mag – pl. a protonok – rezonanciafrekvenciája ugyanabban a molekulában is eltérő lehet. Így pl. az etanol hidrogénjei három eltérő frekvenciánál rezonálnak a metil-, metilén- és OH-csoportbeli H-atomoknak megfelelően.<sup>5</sup> Ezt a jelenséget *kémiai eltolódásnak* nevezzük. Az *NMR-spektrum* ekként egy adott molekula valamely – eltérő környezetben lévő – mágneses magjainak abszorpciós jeleit tartalmazza a frekvencia függvényében ábrázolva.

A kémiai eltolódás ilymódon tájékoztat a vizsgált mag kémiai (molekuláris) környezetéről, más szóval a kémiai szerkezetéről, s ezáltal válik a kémiai szerkezetkutatás nélkülözhetetlen eszközévé.

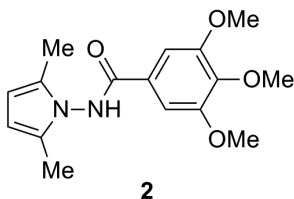
Az etanol  $^1\text{H}$  NMR-jeleinek intenzitásaránya 1:2:3, vagyis a jelintenzitás (a jel alatti terület, integrál) arányos az érte felelős magfajta molekulán belüli relatív számával, így gyakran egyértelművé teheti a jelek hozzárendelését, pl. az etil-alkohol esetén az OH-,  $\text{CH}_2$ - és  $\text{CH}_3$ -hidrogénekhez. Az integrált spektrum analitikai célú felhasználásával a 10.4.1. fejezetben foglalkozunk.

Az elmondottak bonyolultabb esetekben is érvényesek. Például szolgálhat az *N*-(3,4,5-trimetoxibenzoilamino)-2,5-dimetilpirrol (**2**)  $^1\text{H}$  NMR-spektruma (10.9. ábra). A spektrumban hat jel látható a C-Me, a fenil-4-OMe, a fenil-3,5-OMe, a pirrol-H-3,H-4, a fenil-H-2,H-6 és NH-csoportoknak megfelelően 6:3:6:2:2:1 intenzitásokkal (ld. 10.9. ábra).



10.9. ábra. A **2** vegyület  $^1\text{H}$  NMR-spektruma a jelintegrálókkal

A különféle környezetben előforduló magok kémiai eltolódástartománya a  $B_0$  térhez mérten igen kicsiny, protonokra kb.  $20 \cdot 10^{-6} B_0$ -tartomány jellemző. Más magoknál jóval nagyobb a kémiai eltolódás-intervallum ( $^{13}\text{C}$



esetén kb.  $250 \cdot 10^{-6}$ , a  $^{19}\text{F}$ -magra kb.  $600 \cdot 10^{-6}$ ), de  $B_0$ -nál mindenképpen nagyságrendekkel kisebb. A rezonanciafrekvenciák ilyen kicsi különbségeinek pontos mérése nem egyszerű. Méréstechnikai okokból ezért célszerű egy adott *referenshez* viszonyított különbségeket mérni, valamint a rezonanciafrekvencia  $B_0$ -tól való függésének kiküszöbölésére osztani a referens anyag frekvenciájával. A kémiai eltolódást konvencionálisan  $\delta$ -val jelöljük, 2001-es IUPAC definíciója<sup>3</sup> a következő:

$$\delta = \frac{\nu_s - \nu_{\text{ref}}}{\nu_{\text{ref}}}, \quad (10.12)$$

ahol  $\nu_s$  a vizsgált mag,  $\nu_{\text{ref}}$  pedig a referens anyag rezonanciafrekvenciája Hz-ben. Mivel a különböző atommagok  $\delta$ -értéke a  $10^{-6}$ - $10^{-4}$  nagyságrendbe esik, célszerű milliomodrészként, azaz ppm-ben („part per million”) kifejezni. A referens  $^1\text{H}$  és  $^{13}\text{C}$  NMR-spektrumok esetén ma már csaknem kizárólag a tetrametil-szilán ( $\text{SiMe}_4$ , TMS, ld. 10.2.1. pontot is). A más magokra ajánlott referenciavegyületek megtalálhatók az irodalomban.<sup>3</sup>

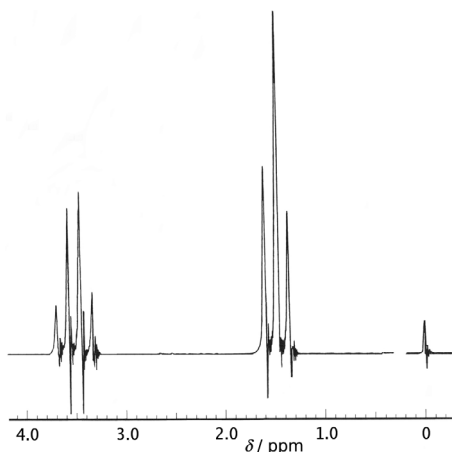
10.2. táblázat. Néhány deuterált oldószer  $^1\text{H}$  és  $^{13}\text{C}$  NMR kémiai eltolódása, forrás- és olvadáspontja

Oldószer	Kémiai eltolódás, $\delta$ / ppm		fp. / °C	op. / °C
	$^1\text{H}$ NMR	$^{13}\text{C}$ NMR		
Aceton- $\text{d}_6$	2,05	30,0; 206,7 <sup>a</sup>	56	-94
Acetonitril- $\text{d}_3$	1,95	1,4; 118,7 <sup>b</sup>	81	-46
Benzol- $\text{d}_6$	7,16	128,4	79	7
Ciklohexán- $\text{d}_{12}$	1,38	26,4	78	7
Diklórmétán- $\text{d}_2$	5,32	55,0	40	-97
DMF- $\text{d}_7$	2,75; 2,92	29,8; 34,9; 163,2 <sup>a</sup>	153	-60
DMSO- $\text{d}_6$	2,50	39,5	190	20
Ecetsav- $\text{d}_4$	2,05	20,1; 179,0 <sup>a</sup>	116	16
Kloroform- $\text{d}_1$	7,24	77,2	61	-64
Metanol- $\text{d}_4$	3,32	49,2	65	-99
Piridin- $\text{d}_5$	7,22; 7,58; 8,74	123,9 <sup>c</sup> ; 135,9 <sup>d</sup> ; 150,4 <sup>e</sup>	114	-41
THF- $\text{d}_8$	1,73; 3,58	25,4 <sup>d</sup> ; 67,6 <sup>e</sup>	64	-108
TFA- $\text{d}_1$	11,5	116,6; 164,2 <sup>a</sup>	71	-15

<sup>a</sup> Karbonil; <sup>b</sup> Nitril; <sup>c/d/e</sup>  $\text{C}_\gamma/\text{C}_\beta/\text{C}_\alpha$

### 10.1.3. Spin–spin kölcsönhatás, spinrendszerek

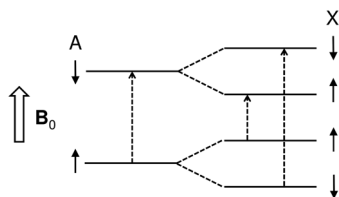
A kémiai eltolódás jelensége arra enged következtetni, hogy egy adott mag NMR-spektruma annyi jelből áll, ahány eltérő kémiai környezetben lévő ilyen atom van a vizsgált molekulában. Bár vannak olyan molekulák, amelyek NMR-spektruma összhangban van ezzel a várakozással (lásd pl. a 10.9. ábrát), igen gyakran már a legegyszerűbbek spektruma is ennél bonyolultabb, ugyanis a rezonanciajeleknek további finomszerkezete van. Az etil-klorid  $^1\text{H}$  NMR-spektrumában pl. a várt két jel helyett hét jelentkezik (10.10. ábra). Feltűnő azonban, hogy a jelek két, összintenzitásukat tekintve 3:2 arányú (nyilvánvalóan a metil-, illetve metilénhidrogéneknek megfelelő) szimmetrikus csoportba rendeződnek, amelyekben a vonalak távolsága megegyezik.



10.10. ábra. Az etil-klorid  $^1\text{H}$  NMR-spektruma 60 MHz-en

Az ilyen *jelmultiplicitások* oka az, hogy az egymáshoz közeli spinek érzékelik a szomszéd kvantumállapotát. A legegyszerűbb esetben – két spin kölcsönhatásakor – az egyik „A” mag környezetében a másik „X” mag kissé megváltoztatja a lokális teret, méghozzá csökkenti, ha alapállapotban van ( $m_x = +1/2$ ), és azonos mértékben növeli, ha gerjesztett állapotú ( $m_x = -1/2$ ). Ezért a (10.4) egyenlet értelmében csökken, illetve nő az A mag rezonanciafrekvenciája (10.11. ábra). Ez az ún. *skaláris spin-spin kölcsönhatás*, más néven *csatolás*. A hatás kölcsönös: az „A” mag kvantumállapota hasonlóan és azonos mértékben hat az „X” mag kémiai eltolódására. Mivel azonban a mágneses kvantumállapotok energia-különbsége igen kicsiny, a kétféle elrendeződés (s ezzel a megfelelő spektrumjelek intenzitása) gyakorlatilag nem különbözik. Ezért mindkét

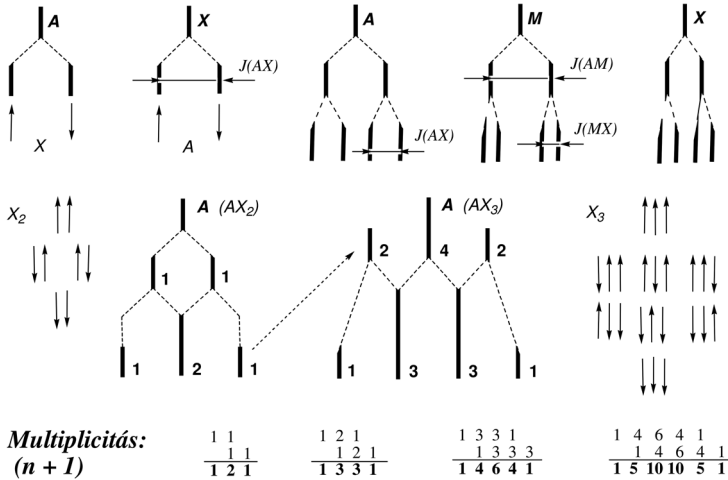
mag jele dubletté hasad fel (10.12. ábra). A kölcsönhatás (a spinek molekulán belüli egymásra hatása) nem függ a  $B_0$  tér nagyságától (frekvenciainvariáns), ezért a felhasadás  $J$ -vel jelölt nagyságát (a multipletteken belüli vonaltávolságot) Hz-ben mérjük és *csatolási állandónak* nevezzük. A kölcsönható magokat  $J$  indexeként ( $J_{AX}$ ), vagy zárójelben, a nagyobb rendszámút előre írva, szokás megadni, pl.  $^nJ(\text{F,H})$ , ahol  $n$  felső index a két magot elválasztó kovalens kötések száma. A  $J$ -értékek – a kémiai eltolódások és a jelintenzitások mellett – a kémiai szerkezetre vonatkozó legfontosabb információforrást jelentik, amelyet az NMR-spektrumokból megkaphatunk.



10.11. ábra. Az A spin energianívóinak felhasadása az X spin két kvantum-állapotának megfelelően. A skaláris kölcsönhatás ezért az AX spinrendszer jeleinek dublett felhasadását okozza

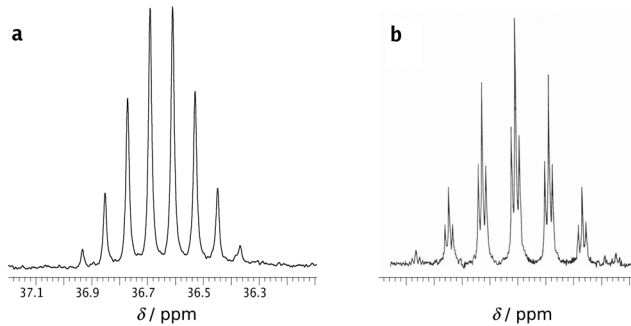
Fentiek fényében érthető az etil-klorid  $\text{A}_2\text{X}_3$  típusú  $^1\text{H}$  NMR-spektruma. Az „A” metilénhidrogének spinjei háromféleképpen oszolhatnak meg a kvantumállapotok között: mindkettő lehet alap-, illetve gerjesztett állapotú, vagy lehetnek ellentétes beállásúak (10.12. ábra). Az első két esetben nő, illetve csökken a lokális tér (s vele a rezonanciafrekvencia), az utóbbiban viszont az X magok körül nem változik, s ez az elrendeződés kétféleképpen lehetséges (az ilyen elrendeződés kétszeres valószínűségű) aszerint, hogy melyik mag gerjesztett, illetve alapállapotú. Így a  $\text{CH}_3$  jele három vonalból áll (triplett), amelyek közül a középső kétszeres intenzitású, ennél  $J$  Hz-el nagyobb, illetve kisebb frekvenciánál pedig egy-egy egyszeres intenzitású jel van. Hasonlóképpen, a  $\text{CH}_2$ -multiplett négy 1:3:3:1 intenzitásarányú vonalból áll (kvartett), a metilspinek 10.12. ábrán látható négyféle elrendeződésének megfelelően.

Figyeljük meg, hogy az  $(n+1)$ -szeres multiplicitást a szomszédcsoport-beli magok  $n$  száma szabja meg. Az izopropil-klorid  $[(\text{CH}_3)_2\text{CHCl}]$  metiljele dublett, a CH-jel szeptett. Az *intenzitásarányok* legegyszerűbben a Pascal-háromszögből kaphatók meg: elindulva az 1:1 dublettől ( $n = 1$ ), a következő  $(n+1)$  multiplett intenzitásarányait úgy kapjuk, ha az előzőket egy hellyel jobbra vagy balra eltolva egymás alá írjuk és összeadjuk, vagy ha az  $n!/[(n-k)!k!]$  binomiális együtthatókként definiáljuk.



10.12. ábra. Az AX, AMX és  $A_2X_3$  spinrendszer multiplicitásai és a jelintenzitások

A trimetil-foszfán-oxid  $[\text{Me}_3\text{PO}]$   $^{31}\text{P}$  NMR-spektrumában így 1:9:36:84:126:126:84:36:9:1 decett lép föl, ahol a leggyengébb szélső jelek eltűnnek az alapzajban (10.13/a. ábra).



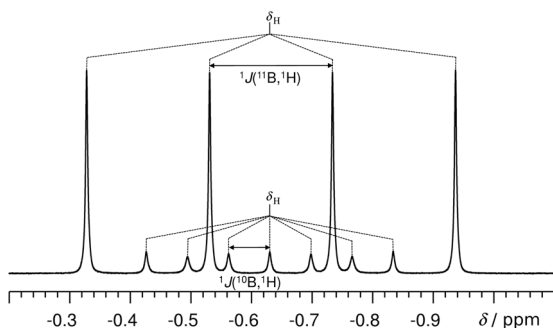
10.13. ábra. A trimetilfoszfán-oxid decetre hasadt jele 162 MHz-es  $^{31}\text{P}$  NMR-spektrumban (a) és az etoxi-bisz(trifluorometil)foszfán triplétt-szeptett  $^{31}\text{P}$ -jele (b)

Ha több, kémiaiailag nem ekvivalens mag (ld. 10.1.4. pont) vagy magcsoport csatolódik egy adott maggal, akkor az  $(n + 1)$ -szabályt az  $(n_1 + 1)(n_2 + 1) \dots$  „szorzat szabály” helyettesíti. Így pl. az akril-nitril ( $\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CN}$ ) három (AMX) hidrogénje kettős dubletteket ad, ahogy azt a 10.12. ábrán látható felhasadási séma szemlélteti. Az etoxi-bisz(trifluorometil)foszfán  $[(\text{CF}_3)_2\text{POEt}]$   $^{31}\text{P}$  NMR-spektrumában 1:6:15:20:15:6:1 relatív intenzitású szeptett jelentkezik (a hat F-maggal csatolás következtében), amelynek minden vonala további triplétté hasad fel (a  $\text{CH}_2$ -csatolás

miatt). A távoli metilhidrogének nem okoznak észrevehető felhasadást (10.13/b. ábra).

Fentiek az  $I = \frac{1}{2}$  spinű magokra érvényesek. Ha  $I > 1$ , akkor a multiplicitást a  $(2nI + 1)$ , illetve a  $(2n_1I_1 + 1)(2n_2I_2 + 1) \dots$  formula adja meg. Például egy ammóniumsó jele a DMSO- $d_6$ -ban felvett  $^1\text{H}$  NMR-spektrumban  $I(^{14}\text{N}) = 1$  miatt három, azonos intenzitású vonalból áll, távolságuk  $^1J(\text{N},\text{H}) = 51$  Hz.

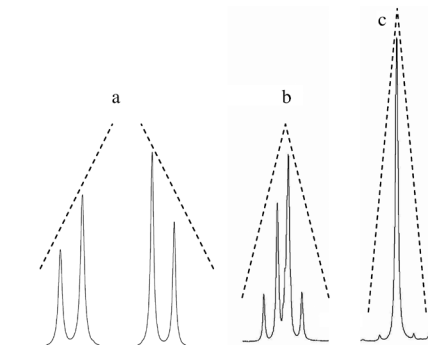
A tetrahidrido-borát  $^1\text{H}$  NMR-spektruma (10.14. ábra) egy-egy közös középpontú négy, illetve hét azonos intenzitású vonalból álló multiplett, ahol a multiplettek összintenzitásának aránya 4:1, a 80% és 20%-os természetes izotóp-előfordulású  $^{11}\text{B}$ - és  $^{10}\text{B}$ -magokkal fellépő csatolásoknak megfelelően ( $I = 3/2$ , illetve 3).



10.14. ábra. A tetrahidrido-borát 400 MHz-es  $^1\text{H}$  NMR-spektruma THF- $d_8$  oldószerben

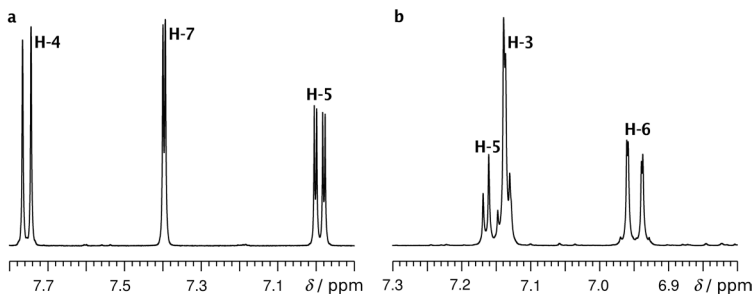
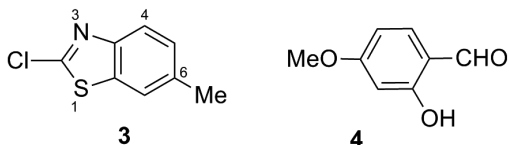
*Az eddigi egyszerű, multiplicitásokra és intenzitásokra vonatkozó szabályok csak gyenge (ún. „elsőrendű”) kölcsönhatások esetén érvényesek, azaz olyankor, ha a kölcsönható magok kémiai eltolódáskülönbsége legalább egy nagyságrenddel nagyobb, mint a csatolási állandó:  $J/\Delta\nu \leq 0,1$ . Ha ez a feltétel nem áll fenn, akkor erős, ún. „magasabb rendű” kölcsönhatás lép fel, amikor a multiplettek egymással átfedhetnek, szimmetrikus szerkezetük eltorzul, s a jelek száma is változhat. A legegyszerűbb esetben az AX spektrum két dublettjének egymáshoz közelebbi (belső) vonalai intenzívebbek, a szélsők gyengébbek (10.15/a. ábra, AB spektrum). Ha az eredeti dublettek csúcsait vonallal kötjük össze,  $\wedge$ -alakú, ún. „háztető”-szerkezetet kapunk, ahol a vonalak lejtése megadja, hogy az egyik dublett (multiplett) párja (ti. a kölcsönható mag vagy csoport jele) a kisebb vagy nagyobb kémiai eltolódások irányába esik, ami hasznos információ a jelhozzárendelések, illetve a szerkezet megállapítása szempontjából. A háztetőszerű szerkezet a kémiai eltolódások egymáshoz közeledtével egyre*

„meredekebbé” válik (10.15/b. ábra), határesetben a középső vonalak akár össze is olvadhatnak (10.15/c. ábra). Ebben az esetben sem szabad azonban összetéveszteni egy szingulett jellel, a jelet szolgáltató két mag kémiai eltolódásai a középső nagy jel „talpában” (két oldalt) vannak!



10.15. ábra. Az AB jelalak változása a  $J/\Delta\nu$  arány növekedésével. A (b) ábrán az intenzitás torzulása a jel alatt megbújó oldószerjel következménye. A (c) ábra intenzív jelének két oldalán megfigyelhető kicsi csúcsok a dublettek külső, intenzitásukban minimálisra csökkent vonalai

Három csatolódó spin ún. rudimentális (a szokásosnál egyszerűbb szerkezetű, mivel  $J(M,X) \approx 0$ ) AMX multiplettjei a **3** benzotiazolszármazék spektrumában (a), és egy erősen csatolt ABX spinrendszeré a **4** benzaldehidszármazék esetén (b) a 10.16. ábrán láthatók.



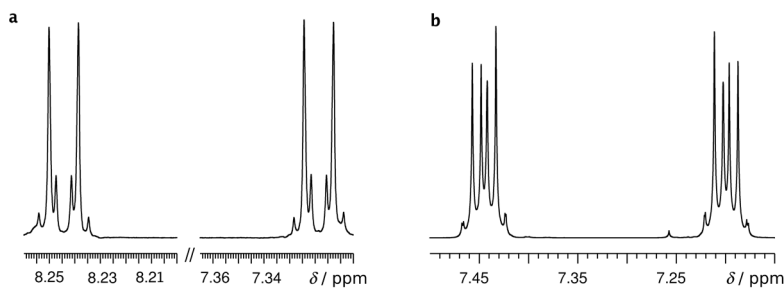
10.16. ábra. A **3** vegyület közel elsőrendű AMX spinrendszerének (a) és a **4** vegyület ABX spinrendszerének (b) 400 MHz-es spektrumai



Az egyszerű, elsőrendű spektrumok multiplettjeiből könnyen megkaphatók a szerkezetazonosítás szempontjából fontos spektrum-paraméterek: a kémiai eltolódások a szimmetrikus multiplettek középpontjaként adódnak, a csatolási állandók pedig vonaltávolságokként olvashatók le. A magasabb rendű spektrumokból a paraméterek csak számításokkal, a kvantummechanikai úton meghatározható, és az egyes spinrendszerekre általánosan érvényes formulák<sup>1,2</sup> segítségével kaphatók meg.

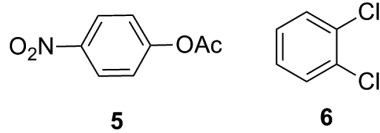
A szimmetriasajátságokat figyelembe véve a molekulák azonos fajta magjait különféle *spinrendszerek*be sorolhatjuk. A kémiaileg ekvivalens magokat az ABC azonos, egymáshoz közeli vagy távoli betűivel jelöljük aszerint, hogy közöttük kicsi vagy nagy a kémiai eltolódáskülönbség és számukat az alsó indexben tüntetjük fel. (E jelölésmódot fentiekben már megelölegeztük.) A CHFCIBr molekula mágneses H- és F-atomjai AX spinrendszert alkotnak (a halogének, kivéve a fluort, mágnesesen inaktívaknak tekinthetők, mivel nem okoznak jelfelhasadást, aminek oka az  $I > 1/2$  spinű magokra jellemző elektromos kvadrupólusmomentum, amely oly mértékben felgyorsítja a relaxációt, hogy a szomszéd magok nem képesek érzékelni e halogénmagok kvantumállapotát); a CH<sub>2</sub>Cl-CHO, az 1,2,3-triklórbenzol és a CH<sub>3</sub>Cl molekulák rendre AX<sub>2</sub>, AB<sub>2</sub> és A<sub>3</sub>; a <sup>13</sup>CHFCI<sub>2</sub>, a CH<sub>2</sub>=CFCl és a CH<sub>2</sub>=CHCl molekulák AMX, ABX és ABC; a CH<sub>2</sub>F<sub>2</sub> és CH<sub>2</sub>=C=CH<sub>2</sub> molekulák A<sub>2</sub>X<sub>2</sub> és A<sub>4</sub>; a <sup>13</sup>CH<sub>3</sub>Cl, CH<sub>3</sub>CHO molekulák AX<sub>3</sub> és AB<sub>3</sub>; a CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>Cl A<sub>2</sub>X<sub>3</sub>; a benzol pedig A<sub>6</sub> spinrendszert képviselnek.

Ha egy kémiaileg ekvivalens magcsoport tagjai egy másik ilyen csoport magjaival eltérő csatolási állandókkal lépnek kölcsönhatásba, *mágnesesen nem ekvivalensnek* nevezzük őket, s ezt a felső indexben vesszővel jelöljük. A legegyszerűbb példa a CH<sub>2</sub>=CF<sub>2</sub> molekula (AA'XX' spinrendszer), ahol a H-atomok kölcsönhatását a két (*cisz*-, illetve *transz*-helyzetű) fluorral különböző csatolási állandók jellemzik.

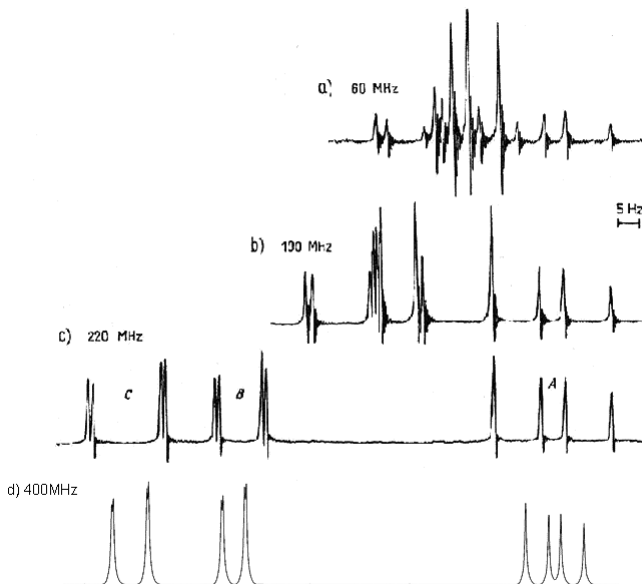


10.17. ábra. Az 5 *p*-diszubsztituált benzolszármazék AA'XX' multiplettjei 800 MHz-en (a) és a 6 *o*-diklórbenzol AA'BB' multiplettje 400 MHz-en (b)

Hasonló a helyzet a  $p$ -R-C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>-R' típusú vegyületeknél, ahol a két R melletti ekvivalens H az R' mellettiek egyikével *orto*-, a másikkal viszont *para*-helyzetű, így csatolási állandói jelentősen különböznek (~8 és ~1 Hz). Ilyenkor az R és R' szubsztituensektől függően AA'XX' vagy AA'BB' spinrendszerre jellemző spektrumok jelentkeznek (10.17. ábra). A különböző spinrendszerekre különböző szerkezetű NMR-spektrumok jellemzőek, de az egyes spinrendszerek spektrumparamétereinek kiszámítására azonos kvantummechanikai formulák érvényesek.<sup>1,2</sup>

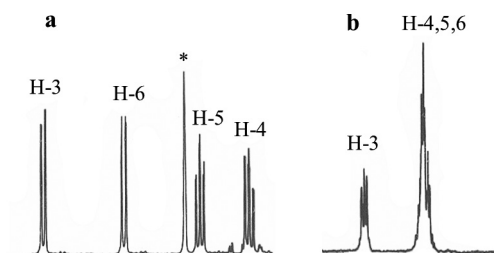


Bizonyos esetekben ugyanaz a molekula más-más spinrendszert képviselhet a felvételi körülmények – így a  $B_0$  tér, az oldószer vagy a hőmérséklet – függvényében. A  $B_0$  tér nagyságának szerepe a  $J/\Delta\nu$  aránynak a kémiai eltolódást befolyásoló hatásából adódik. Mivel  $\Delta\nu$  a  $B_0$  nagyságával arányosan változik, míg  $J$ -t ez nem befolyásolja ( $J$  frekvenciainvariáns!), ha  $B_0$  elég nagy, gyakran teljesül az elsőrendű felhasadás feltétele, és pl. a kisebb  $B_0$  esetén AB vagy ABC típusú spektrum AX, illetve AMX szerkezetűvé egyszerűsödik.



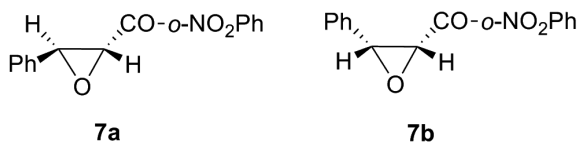
10.18. ábra. Akрил-nitril (CH<sub>2</sub>=CHCN) <sup>1</sup>H NMR-spektruma 60, 100, 220 és 400 MHz-en

Utóbbi spinrendszerváltozást szemlélteti a 10.18. ábra, amelyen az akril-nitril 60 MHz-en ABC típusú spektruma (a) 100 MHz-en (b), majd 220 MHz-en (c) ABX, illetve AMX-et közelítő típusú multiplettekből felépülő spektrumként regisztrálható, míg ugyanez 400 MHz-en (d) mérve már gyakorlatilag tiszta elsőrendű spektrumot szolgáltat (az ábra részben az NMR történelmi fejlődését is tükrözi, hiszen a 60, illetve 100 MHz-es spektrométerek ma már egyre ritkábban használatosak).



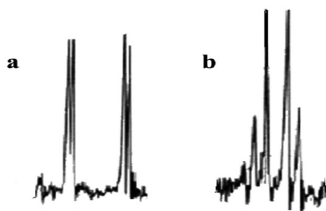
10.19. ábra. Az *o*-nitrobenzolszulfonsav  $^1\text{H}$  NMR-spektruma  $\text{CDCl}_3$ -ban (a) és  $\text{DMSO}-d_6$ -ban (b)

Az oldószer spinrendszert befolyásoló hatását a 10.19. ábra szemlélteti az *orto*-nitrobenzolszulfonsav Na-sójának  $\text{CDCl}_3$ -ban, illetve  $\text{DMSO}-d_6$ -ban készült  $^1\text{H}$  NMR-spektrumával. A spektrum látványos változása az egyes gyűrűprotonok kémiai eltolódását eltérő mértékben megváltoztató *specifikus oldószerhatás* következménye. Ez a jelenség felhasználható pl. a véletlen izokronia (ld. 10.1.4. pont) megszüntetésére. Így pl. a metil-acetilén szingulett jele ( $\text{CH}_3\text{C}\equiv\text{CH}$ )  $\text{CDCl}_3$  helyett  $\text{CDCl}_3:\text{DMSO}-d_6$  1:1 térfogatarányú keverékében felvéve bonyolult  $\text{AB}_3$  típusú multipletté alakul (lásd alább). Az adott feltételekkel a valónál egyszerűbb felépítésű, ún. rudimentális spektrumok (pl.  $\text{AX}_2$  multipletteket adó ABX spektrumok) más oldószerben, más hőmérsékleten (a hőmérséklet függvényében változó spektrumok kérdésével a 10.1.9. pont foglalkozik) vagy eltérő erősségű, más  $B_0$  térben a „valódi” bonyolultabb szerkezetű formában jelenhetnek meg.



A spin-spin kölcsönhatás nagysága felhasználható szerkezeti kérdések tisztázására is. Például a **7a** és **7b** gyűrűizomerek könnyen („ránézéssel” is) megkülönböztethetőek AX, illetve AB típusú  $^1\text{H}$  NMR-spektrumuk alapján (10.20. ábra). A  $J/\Delta\nu$  arány ui. a **7a** *transz*-izomernél 0,06, míg

*cis* párja, **7b** esetén 0,41, tehát előbbinél teljesül az elsőrendű felhasadás feltétele, míg utóbbinál nem.<sup>6</sup>



10.20. ábra. Az oxirán-gyűrűs hidrogének jele a **7a** *transz* (a) és **7b** *cis* (b) 2-fenil-3-*o*-nitro-benzoil-oxirán <sup>1</sup>H NMR-spektrumában 60 MHz-en

#### 10.1.4. Molekulaszimmetria az NMR-ben

Az NMR-spektroszkópia nagy előnye, hogy kiválóan alkalmas a molekulák térszerkezetének vizsgálatára. A 10.3. fejezetben bemutatott bonyolultabb mérés technikák mellett már a legegyszerűbb, egydimenziós NMR-spektrumok is sokat elárulhatnak a molekula térszerkezetéről. Mindez azt is jelenti, hogy az NMR-spektrumok értelmezéséhez elengedhetetlen, hogy a molekulákat mindenkor térbeli alakzatoknak tekintsük. (Miótán a kémiai képleteket síkban ábrázoljuk, ettől a látásmódtól a sztereokémiai problémák vizsgálatakor el kell tekinteni.)

Már utaltunk rá, hogy az azonos szimmetriahelyzetű magok (például metilprotonok) kémiai eltolódása azonos. Az ilyen magokat *kémiaileg ekvivalens* (*izokrón*) magoknak nevezzük. Akirális közegben a *kémiai ekvivalencia* szükséges és egyben elégséges feltétele, hogy a molekulának legyen olyan szimmetriatengelye, mellyel az azonos fajta két vagy több mag egymásba transzformálható. A szimmetriasíkkal egymásba transzformálható, azonos fajta magok csak akirális környezetben izokrónok. A CH<sub>2</sub>ClBr molekula hidrogénjei pl. a C-, Cl- és Br-atomok alkotta szimmetriasíkkal egymásba transzformálhatók, így akirális környezetben (akirális oldatban) kémiaileg ekvivalensek, királis környezetben viszont anizokrónok, ún. *enantiotóp* magok. Az akrilsav (CH<sub>2</sub>=CHCOOH) hidrogénjei azonban annak ellenére, hogy van szimmetriasík (a molekula síkja), nem transzformálhatók egymásba, ún. *diasztereotóp* magok és a körülményektől függetlenül kémiaileg nem ekvivalensek. Véletlenül azonban adhatnak egybeeső kémiai eltolódású jeleket, ez a *véletlen izokrónia*. Például a CH<sub>3</sub>C≡CH molekula hidrogénmagjai CDCl<sub>3</sub>-oldatban, 60 MHz-en, mint már említettük (355. o.), egyetlen szingulett jelet adnak. A diasztereotópia fontos és gyógyszerhatóanyagok esetén gyakran előforduló esete az, amikor a molekulának egy vagy több kiralitáscentruma van.

Ekkor a molekula metilénhidrogénjei mindig diasztereotópok és gyakran a vártnál bonyolultabb multipletteknek adnak.

## 10.1.5. $^1\text{H}$ NMR-spektrumok. A spektrumparaméterek és a kémiai szerkezet kapcsolata

### 10.1.5.1. A kémiai eltolódást meghatározó tényezők

#### 10.1.5.1.1. Diamágneses hozzájárulás

A 10.1.2. pontban leírtuk, hogy az atommagok (10.5) egyenlettel definiált  $\nu_0$  rezonanciafrekvenciájának változása a molekuláris kötélekben – a  $\delta$  kémiai eltolódás – a magok környezetében mozgó elektronok keltette lokális mágneses tér következménye. A kémiai eltolódás tehát a molekula sok tényező által – és csak nehezen leírható módon – befolyásolt elektronszerkezetének függvénye. Ezért a kémiai eltolódások elméleti számítása nehéz feladat, ami bonyolultabb szerkezetek esetén a kvantumkémiai módszerek tökéletesedése ellenére sem ad kielégítő eredményeket. Tapasztalati úton azonban a gyakorlatban jól használható elvek, összefüggések és módszerek birtokába juthatunk. Célszerű megkülönböztetnünk az egyes magokra ható – ezek kémiai eltolódását meghatározó – törzs-, vegyérték- és a kiszemelt magtól a molekulában távolabb lévő elektronokat.

A gömbszimmetrikus törzselektronok a Lenz-törvény értelmében a  $B_0$  térrel ellentétes irányú lokális teret indukálnak, „árnyékolják”, azaz csökkentik  $B_0$ -t: az érzékelt  $B'_0$  tér kisebb, mint  $B_0$ , s ezért fellép a *kémiai eltolódás*. Ez a *diamágneses (upfield) árnyékolás*, amelynek mértékét a  $\sigma^d$  árnyékolási tényező szabja meg. Minél nagyobb a mag körül az elektronsűrűség (a törzselektronok száma), annál erősebb az árnyékolás, annál nagyobb a diamágneses eltolódás (s annál kisebb a kémiai eltolódás: annál közelebb van a jel a TMS-éhez).\*

Fentiek fényében érthető, hogy a H-, C- és Pb-atomokra  $\sigma^d$  értéke  $1,8 \cdot 10^{-5}$ ;  $2,6 \cdot 10^{-4}$  és  $1 \cdot 10^{-2}$ . A  $\text{Me}_3\text{N}$  és  $\text{Me}_3\text{N} \cdot \text{HCl}$  hidrogénjeire  $\delta = 2,13$

\* Az „upfield” kifejezés az NMR-spektroszkópia hőskorából származik, amikor a spektrumok felvétele még a spektrumtartomány fokozatos átsöpprésével (sweep) történt, mégpedig a rezonanciafrekvencia állandó értéken tartása mellett, a homogén  $B_0$  tér kismértékű változtatásával. Ekkor ahhoz, hogy a teret csökkentő árnyékolás ellenére az adott mag rezonanciafrekvenciája ne változzék, az árnyékolást kompenzáló nagyobb teret kellett alkalmazni. Ebből a korszakból maradt meg a mai napig használt kifejezés, miszerint az „upfield” a kisebb, a „downfield” pedig a nagyobb kémiai eltolódásokat jelenti.

és 3,20 ppm, a ciklopentadienánanion, a benzol és a tropiliumkation  $\delta H$ -adatai: 5,64; 7,37 és 9,24 ppm. Általános szabályként kimondható, hogy a rokon szerkezetű molekulákban a  $\delta H$ -érték többnyire a H körüli elektronsűrűséggel fordítottan arányos. Ezzel összhangban a szénatom rendűségével (a csökkenő elektronsűrűséggel) párhuzamosan nő a kapcsolódó hidrogének kémiai eltolódása. A  $CH_3$ -,  $CH_2$ - és  $CH$ - csoportokra jellemző  $\delta$ -intervallumok: 0–4,5; 0,5–5,5 és 1,0–7,5 ppm.

A ciklopropán, aziridin, tiorán és oxirán gyűrűhidrogénjeit a heteroatom növekvő  $-I$  -effektusának megfelelően növekvő kémiai eltolódások jellemzik: 0,22; 1,62; 2,49 és 2,58 ppm.

Figyelmet érdemel, hogy a háromtagú gyűrűs vegyületek hidrogénjeit a hajlott kötések elektronjaitól származó erős árnyékoló hatás következtében rendhagyóan kis  $\delta$ -értékek jellemzik.

Mivel a szubsztituensek többsége elektronegatív (elektronszívó) természetű, a geminális hidrogének eltolódása a telített vegyületekben legtöbbször jóval nagyobb a többi hidrogénénél, jól elkülönül, és a szerkezetkutatás számára „detektorjelül” szolgál. Így pl. a ciklohexanolra a  $\underline{C}H(OH)$  eltolódás 3,17 ppm, míg a többi gyűrűhidrogén jele 1,4–1,7 ppm között van. A szénhidrátok anomer (acetálos) hidrogén- (és szén-) jele különösen jól azonosítható a két szomszédos oxigén összegződő  $-I$ -effektusának következtében:  $\delta H(O-CH-O) > 4,5$  ppm (ld. pl. 10.3.2.1. fejezet),  $\delta C(O-C-O)$ : 80–110 ppm.

#### 10.1.5.1.2. Paramágneses hozzájárulás

A diamágnessel ellentétes  $\sigma^p$  paramágneses hozzájárulás a könnyen gerjeszthető kötőelektronoktól ered. Olyan molekulákban, amelyekben vannak könnyen gerjeszthető kötőelektronok, ezeket a mágneses tér perturbálja, ami a  $B_0$  térrel azonos irányú lokális teret indukálva növeli ennek nagyságát. Ez a hatás az  $^1H$  NMR-spektrumoknál nem jelentkezik, mert a hidrogén kötőelektronjainak nagy a gerjesztési energiája. A nagyobb rendszámú atomoknál azonban  $\sigma^p$  meghatározó szerephez jut a kémiai eltolódásokat megszabó hozzájárulások között. A  $^{13}C$ -magra vonatkozó elméleti számítások szerint a  $\sigma^p$  hozzájárulása a kémiai eltolódáshoz több mint egy nagyságrenddel nagyobb, mint a  $\sigma^d$  komponenstől származó.

A molekulapályákat atomi pályák lineáris kombinációjaként leíró elmélet szerint a  $\sigma^p$ -hozzájárulás fordítottan arányos az elektron magtól való távolságának harmadik hatványával. Ennek következtében a mag körüli elektronsűrűség növekedése  $\sigma^p$  csökkenésével, vagyis árnyékolás-

növekedéssel jár, tehát éppen úgy, mint a nagyobb  $\sigma^d$ , kisebb kémiai eltolódást eredményez. Tehát a mag körüli elektronsűrűség-változás azonos irányú változását okozza mind a  $\sigma^d$ -, mind pedig a  $\sigma^p$ -hozzájárulás a  $^{13}\text{C}$  és más nagy rendszámú izotópok esetében is, vagyis ez az összefüggés – csökkenő elektronsűrűség - növekvő kémiai eltolódás – mind az  $^1\text{H}$ , mind a  $^{13}\text{C}$  NMR-spektroszkópiában érvényes.

### 10.1.5.1.3. Anizotróp hozzájárulás – szomszédcsoporthatás

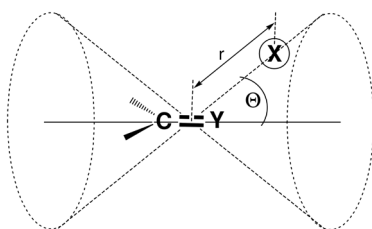
A törzs- és kötőelektronok mellett a molekula távolabbi elektronjai is befolyásolják egy adott mag (X) kémiai eltolódását. Ez a hozzájárulás irányfüggő, a mag és az elektron(ok) kölcsönös helyzetétől függ (10.21. ábra). Nagyságát a legegyszerűbb esetben, tengelyszimmetrikus funkciós csoportok  $\pi$ -elektronjai (kettős vagy hármas kötések elektronjainak) hatását tekintve, a McConnell-egyenlet adja meg:

$$\Delta\sigma = [(\cos^2 \theta - K) / r^3] \cdot \Delta\chi, \quad (10.13)$$

ahol  $\theta$  a kétatomos funkciós csoport (amelyhez a magra ható elektronok tartoznak) szimmetriatengelye és a kötéstávolság középpontját a maggal összekötő egyenes bezárta szög,  $r$  az elektronok távolsága az X magtól,  $\Delta\chi$  a funkciós csoport ún. mágneseles szuszceptibilitásának anizotrópiája,  $K$  pedig tapasztalati konstans.

A (10.13) egyenletből következik, hogy a 10.21. ábra síkját négy szegmensre bonthatjuk: két-két szemben fekvő szegmensben a funkciós csoport hatása a magra ellentétes előjelű (aszerint, hogy  $\cos^2\theta$  a  $K$ -nál kisebb vagy nagyobb). Kiterjesztve a hatást a harmadik dimenzióba, egyes funkciós csoportokhoz, a 10.21. ábrán láthatóhoz hasonló, árnyékolási kúppárok rendelhetők, amelyek belsejében az ott lévő magokra gyakorolt árnyékoló hatás ellentétes előjelű, mint a kúpon kívül elhelyezkedőkre.

Az anizotróp szomszédcsoporthatás magyarázza pl. az aldehid-hidrogének igen nagy kémiai eltolódását (vö. 10.4. táblázat), vagy azt a megfigyelést, hogy míg a metil- és etil-halogenidek hidrogénjeinek



10.21. ábra. Funkciós csoport mágneses anizotrópiája

a I, Br, Cl sorban növekszik a kémiai eltolódása (a halogén növekvő –I-effektusa miatt csökken a H-atomok körül az elektronsűrűség), addig a  $(\text{CH}_3)_2\text{CHX}$  sorozatban a CH- (metin-) hidrogéné ellentétes irányban változik (10.3. táblázat). Utóbbi vegyületekben az elektronsűrűség-változás árnyékoltságot befolyásoló hatását ugyanis túlkompenzálja a halogének anizotróp hatása.

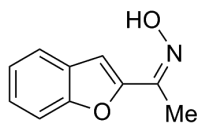
10.3. táblázat. Halogénnel szomszédos első-, másod- és harmadrendű szénatomhoz kapcsolódó hidrogének  $^1\text{H}$  NMR kémiai eltolódása

X	$\text{CH}_3\text{X}$	$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{X}$	$(\text{CH}_3)_2\text{CHX}$
F	4,27*	4,13*	3,67*
Cl	3,05	3,57	4,13
Br	2,68	3,36	4,20
I	2,16	3,15	4,25

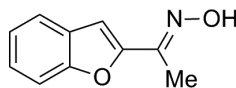
\*Multiplett (*d*, *dqa*, *dsp*) jelek a  $^{19}\text{F}$ -maggal való csatolás miatt

A hármas kötés árnyékolást növelő anizotróp hatása – mely a  $\pi$ -elektronok indukálta paramágneses momentumtól származik – magyarázza, hogy az  $sp^3$ ,  $sp^2$  és  $sp$  szenekhez kapcsolódó hidrogének relatív elektronsűrűség alapján várt növekvő eltolódása sem az  $^1\text{H}$ , sem pedig a  $^{13}\text{C}$  NMR-spektrumban nem követ monoton sorrendet: etán (0,86 és 6,6 ppm), etén (5,25 és 122,5 ppm) és acetilén (1,80 és 71,9 ppm).

Az anizotróp szomszédcsoport-hatás sokoldalúan hasznosítható a szerkezetkutatásban. Például a benzofuril-metil-ketoximok *syn*- (**8a**) és *anti*- izomerjei (**8b**), az N—O kötés ezen hatását kiaknázva, egyszerűen megkülönböztethetők. A gyűrűt az oximszénatommal összekapcsoló kötés körüli forgás közben a *syn*-izomerben ez a kötés közel kerülhet a furilhidrogénhez, s anizotróp hatása jelentős (kb. 0,8 ppm) paramágneses eltolódást okoz az *anti*-izomer analóg jeléhez képest.<sup>7</sup>



**8a**



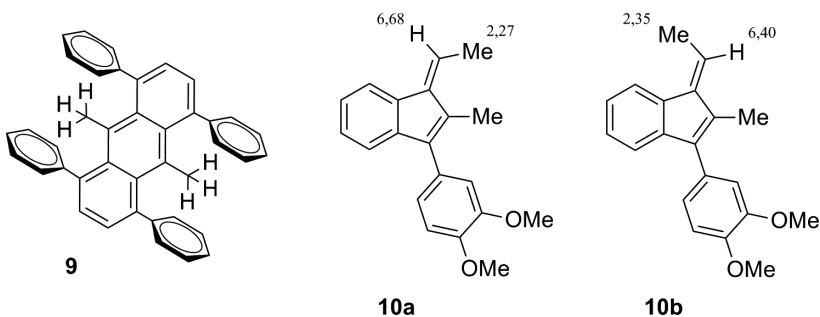
**8b**

Az anizotróp hatás különösen jelentős az aromás vegyületeknél, ahol a  $\pi$ -szextett indukálta erős lokális tér nagy eltolódásváltozások forrása lehet. A benzol anizotróp kúpja a gyűrű síkja „föltre” és „alatt” jelentős árnyékolásnövekedést okoz, míg a gyűrűvel koplánáris magok jele –



beleértve a gyűrűhidrogénekét is – paramágnesesen (downfield), azaz a nagyobb kémiai eltolódások irányába tolódnak el. Ennek klasszikus bizonyítéka a 9,10-dimetil-antracén **9** tetrafenilszubsztituált származékában a  $\delta(\text{CH}_3)$  szingulett nagy (1,3 ppm-es) diamágneses eltolódása.

Kihasználva a benzolgyűrű anizotróp hatását geometriai izomerek is jól megkülönböztethetők, így az **10a** és **10b** indénszármazékok. Az etilidencsoport  $\text{CH}_3$  és  $\text{CH}$  jelei ugyanis ellentétesen tolódnak el az izomerek spektrumában: **10a** esetén a kondenzált gyűrűhöz közelebb lévő, vele koplánáris H-atom, **10b** párjában pedig a metilcsoport jele tolódik el paramágnesesen a másik izomerhez képest (0,28, illetve 0,08 ppm-mel).<sup>8</sup>



Az anizotróp hatás konfigurációs kérdések megoldásában való kiaknázását korlátozza, hogy a lehetséges izomerek mindegyikének kezünkben kell lennie (pl. **8a-8b** vagy **10a-10b** párok). Ez a gyakorlatban

10.4. táblázat. A metilcsoport  $^1\text{H}/^{13}\text{C}$  NMR kémiai eltolódása különböző szubsztituensekre

szubsztituens	$\delta\text{H} / \text{ppm}$	$\delta\text{C} / \text{ppm}$	szubsztituens	$\delta\text{H} / \text{ppm}$	$\delta\text{C} / \text{ppm}$
–H	0,13	–2,3	–Ph	2,32	21,4
–Me	0,86	5,7	–SOCl	2,50	52,4
–C(Me) <sub>3</sub>	1,01	32,0	–COPh	2,55	24,9
–CH=CH <sub>2</sub>	1,71	19,4	NHAc	2,71	21,0
–C≡CH	1,80	5,9	–NC	2,85	26,8
–SH	2,00	6,6	–OMe	3,24	61,5
–COOMe	2,01	20,0	–OH	3,47	50,2
–CONH <sub>2</sub>	2,02	25,5	–SO <sub>2</sub> Cl	3,60	52,2
–COOH	2,08	21,1	–OAc	3,67	28,1
–SMe	2,09	19,6	–OPh	3,73	54,0
–CHO	2,20 d	31,2	–NO <sub>2</sub>	4,33	57,1
–NMe <sub>2</sub>	2,27	48,1	–NH <sub>2</sub>	4,72	26,9

nem mindig teljesül, a mért eltolódás pedig önmagában csak abban az esetben bizonyító erejű, ha az adott molekulacsalád sok és eltérő izomerszerkezetű képviselőjének eltolódásait ismerjük.

Sok vegyület kémiai eltolódásainak tanulmányozásából leszűrhető következtetés, hogy az egyes funkciós csoportok, bizonyos szerkezeti elemek kémiai eltolódást befolyásoló hatása specifikus és additív.

10.5. táblázat. Funkciós csoportok  $^1\text{H}$  és  $^{13}\text{C}$  NMR kémiai eltolódástartomány\*

Funkciós csoport	Kémiai eltolódás, $\delta$ / ppm		Funkciós csoport	Kémiai eltolódás, $\delta$ / ppm	
	$^1\text{H}$ NMR	$^{13}\text{C}$ NMR		$^1\text{H}$ NMR	$^{13}\text{C}$ NMR
$\text{CH}_2^{**}$	0,2 – 1,1	0 - 10	$>\text{CH}-\text{C}(\text{sp}^2)$	2,20 – 2,80	30 – 70
$\text{CH}_3-\text{C}(\text{sp}^3)$	0,7 – 2,0	0 - 30	$-\text{CH}_2\text{Cl}$	2,25 – 3,70	35 – 55
$\text{CH}_3-\text{S}$	2,0 – 2,8	5 - 20	$\text{C}-\text{CH}_2-\text{N}$	2,25 – 3,60	35 – 75
$\text{C}-\text{CH}_2-\text{C}$	0,95 – 2,05	10 - 70	$>\text{CHCl}$	3,25***	35 – 85
$\text{C}-\text{CH}_2-\text{S}$	2,35 – 3,00	15 - 60	$>\text{CH}-\text{N}$	2,25***	40 – 90
$>\text{CH}-\text{C}$	1,20 – 2,40	15 - 70	$\text{CH}_3-\text{O}$	3,2 – 4,3	45 – 65
$\text{C}(\text{sp}^3)-\text{CH}_2-\text{C}(\text{sp}^2)$	1,85 – 2,45	20 - 60	$\text{CH}_3-\text{N}=\text{C}$	3,2 – 4,6	35 – 45
$\text{C}(\text{sp}^2)-\text{X}$	5,8 – 6,5	20 - 100	$\text{C}-\text{CH}_2-\text{O}$	3,35 – 4,50	55 – 90
$\text{CH}_3-\text{C}(\text{sp}^2)$	1,5 – 2,8	5 - 30	$>\text{CH}-\text{O}$	3,65 – 6,0	65 – 100
$\text{CH}_3-\text{C}(\text{sp})$	1,8 – 2,2	1 – 5	$\text{CH}_2=\text{C}$	3,5 – 7,0	80 – 135
$\text{C}(\text{sp})\text{H}$ , $\text{C}(\text{sp})$	1,0 – 3,3	20 - 100	$\text{C}_{\text{Ar}}\text{H}$	6,2 – 8,5	80 – 140
$\text{CH}_3-\text{N}$	1,8 – 3,8	25 - 50	$-\text{COOH}$	9 - 12	160 – 185
$>\text{CH}-\text{S}$	2,35***	25 - 75	$-\text{CHO}$	9,5 – 10,5	185 – 210
$\text{O}-\text{C}(\text{sp}^3)-\text{O}$		85 – 110	$-\text{NC}$		150 – 170
$\text{C}_{\text{Ar}}-$		90 – 160	$-\text{CO}-\text{Y}$		150 – 180
$-\text{SCN}$		110 – 120	$-\text{CSO}$		190 – 210
$\text{C}\equiv\text{N}$		115 – 125	$-\text{CSN}$		190 – 210
$-\text{NCO}$		115 – 130	$=\text{C}=\text{C}=\text{C}$		200 – 220
$-\text{NCS}$		125 – 140	$-\text{CO}-$		205 – 220
$>\text{C}=\text{N}$		145 – 170	$-\text{CS}-$		220 – 240

\*Mivel a megadott  $\delta$ -intervallumok nagyon eltérő számú adatokra vonatkoznak, csak tájékoztató jellegűek. Jelentősen eltérő értékek is előfordulhatnak.

\*\*Ciklopropilgyűrűben; \*\*\*Átlagértékek, amelyek a két további szubsztituenstől függően tág határok között változhatnak

Ezért egyrészt számos vegyületcsoportra jellegzetes kémiai eltolódástartományok állapíthatók meg a kísérleti adatokból, másrészt additivitási

szabályok szűrhetők le, s például monoszubsztituált vegyületek adatai felhasználhatók a többszörösen helyettesített analógok várható kémiai eltolódásainak kiszámítására (ld. pl. 10.6. táblázat).

A 10.4. táblázatban metilcsoportot tartalmazó vegyületek eltolódásait mutatjuk be, néhány gyakran előforduló funkciós csoport jellemző  $^1\text{H}$  és  $^{13}\text{C}$  NMR-eltolódásai pedig a 10.5. táblázatban találhatóak. A hasonló – gyakran grafikusán ábrázolt (ún. korrelációs) – táblázatok gyors tájékozódást tesznek lehetővé a várható kémiai eltolódásokat illetően.

10.6. táblázat. Szubsztituenskonstansok többszörösen helyettesített normál lánccú alkánok  $^{13}\text{C}$  NMR kémiai eltolódásainak közelítő számításához\*:

$$\delta C_i = -2,3 + \sum \rho^i \quad (i = \alpha, \beta \text{ vagy } \gamma)$$

szubszt.	$\rho^\alpha$	$\rho^\beta$	$\rho^\gamma$	szubszt.	$\rho^\alpha$	$\rho^\beta$	$\rho^\gamma$
-I	-7,0	11,0	-1,5	-NH <sub>2</sub>	29,0	11,5	-5,0
-CN	3,0	2,5	-3,0	-COR	30,0	3,0	-3,0
-C(sp)	4,5	5,5	-3,5	-CHO	31,0	0	-3,0
-SH	11,5	12,0	-3,0	-Cl	31,0	11,0	-5,0
-Br	19,0	11,0	-4,0	-NMe <sub>2</sub>	42,0	6,0	-3,0
-C(sp <sup>2</sup> )	19,5	7,0	-2,0	-OH	49,0	10,0	-6,0
-COOH	20,0	2,0	-3,0	-OAc	54,0	6,0	-5,0
-SR	21,0	6,5	-3,0	-SO <sub>2</sub> Cl	55,0	3,5	-3,0
-CONH <sub>2</sub>	22,0	2,5	-3,0	-OR	58,0	8,0	-4,0
-Ph	22,0	9,5	-2,5	-NO <sub>2</sub>	63,0	4,0	-1,0
-COOR	22,5	2,0	-3,0	-F	70,0	8,0	-6,0

\* Kihhasználva a szubsztituensek hatásának additivitását a konstansok az alapvegyülethez képest a monoszubsztituált származékokban mért eltolódásváltozásokból nyerhetők. A szubsztituensek negyedik (δ-) szénatomra gyakorolt hatása  $\geq 1$  ppm.

A többszörösen helyettesített alkánok  $^{13}\text{C}$  NMR és benzolszármazékok  $^1\text{H}$  és  $^{13}\text{C}$  NMR kémiai eltolódásainak kiszámítására alkalmas additivitási formula és a monoszubsztituált vegyületek adataiból adódó additivitási paraméterek a 10.6. és 10.7. táblázatokban szerepelnek.

10.7. táblázat. A szubsztituensek *orto*-, *meta*- és *para*-hidrogének/szénatomok  $^1\text{H}/^{13}\text{C}$  NMR kémiai eltolódását befolyásoló hatása a monoszubsztituált benzolszármazékokban:  $\delta\text{ArH} / \delta\text{ArC} = 7,25 / 128,5 + \Sigma \rho^i$

szubsztituens	$\rho^{\text{subst}}$	$\rho^{\text{orto}}$	$\rho^{\text{meta}}$	$\rho^{\text{para}}$			
-NH <sub>2</sub>	18,0	-0,75	-13,3	-0,25	0,9	-0,65	-9,8
-NMe <sub>2</sub>	23,0	-0,65	-16,0	-0,2	2,0	-0,65	-12,0
-OH	26,9	-0,6	-12,7	-0,1	1,4	-0,5	-7,3
-Me	8,9	-0,20	0,7	-0,12	-0,1	-0,22	-2,9
-OMe	31,4	-0,5	-14,4	-0,1	1,0	-0,45	-7,7
-F	34,8	-0,25	-12,9	0,0	1,4	-0,2	-4,5
-OAc	23,0	-0,25	-6,4	0,05	1,3	-0,15	-2,3
-SH	2,2	-0,1	0,7	-0,2	0,4	-0,2	-3,1
-C(Me) <sub>3</sub>	22,1	-0,1	-3,4	0	-0,4	-0,25	-3,1
-Cl	6,2	0,05	0,4	-0,1	1,3	-0,1	-1,9
-CH=CH <sub>2</sub>	7,6	0,05	-1,8	-0,5	-1,8	-0,1	-3,5
-C≡CH	-6,1	0,15	3,8	0	0,4	0	-0,2
-Br	-5,5	0,2	3,4	-0,1	1,7	-0,05	-1,6
-CN	-15,4	0,4	3,6	0,2	0,6	0,3	3,9
-I	-34,1	0,4	8,7	-0,3	1,4	0	-1,6
-NHAc	11,1	0,4	-9,9	-0,2	0,2	-0,3	-5,6
-Ph	13,0	0,4	-1,1	0,2	0,5	0,1	-1,0
-CHO	8,6	0,55	1,3	0,2	0,6	0,3	5,5
-Ac	9,1	0,6	0,1	0,1	0	0,2	4,2
-CONH <sub>2</sub>	5,4	0,6	-0,3	0,1	-0,9	0,2	5,1
-SO <sub>2</sub> Cl	15,6	0,8	-1,7	0,35	1,2	0,45	6,8
-COOH	2,1	0,85	1,5	0,2	0	0,3	5,1
-COOMe	1,8	0,7	1,0	0,1	-0,2	0,2	4,3
-NO <sub>2</sub>	20,0	0,95	-4,8	0,25	0,9	0,40	5,8

### 10.1.5.2. A H,H-csatolási állandók és a kémiai szerkezet közötti kapcsolatok

A kémiai eltolódások mellett a csatolási állandók jelentik a szerkezetkutatásban hasznosítható másik legfontosabb információfajtát, amelyet az NMR-spektrumokból nyerhetünk. Különösen sztereokémiai

problémák vizsgálatában nagy a csatolási állandók jelentősége és számos ilyen kérdés tisztázását éppen az NMR-spektroszkópia tette lehetővé. A homonukleáris H,H-csatolásokra érvényes törvényszerűségek, tapasztalati szabályok többsége más magok egymás közötti és heteronukleáris kölcsönhatásaira is érvényesek. Mivel a csatolási állandók nagyságát a kölcsönható magok fajtája és a kötések természete mellett az azokat összekötő/elválasztó kovalens kötések száma határozza meg, ez utóbbi szempont alapján csoportosítva tekintjük át a legfontosabb összefüggéseket a H,H-csatolások és a kémiai szerkezet között.

A szerkezetkutatási gyakorlat szempontjából legfontosabb homo- és heteronukleáris csatolási állandók nagyságáról a 10.8. táblázat nyújt áttekintést.

#### 10.1.5.2.1. Geminális ${}^2J(\text{H,H})$ csatolások

Telített vegyületekben az azonos szénatomhoz kapcsolódó hidrogének egymás közötti csatolásai, a geminális  ${}^2J(\text{H,H})$  csatolások negatívak. Ennek azonban csak elméleti jelentősége van és elsőrendű spinrendszereknél  $J$  előjele nem is befolyásolja a spektrumok szerkezetét. A metil- és metilénprotonok egymás közötti csatolása – további kölcsönhatások hiányában – nem jár felhasadással, de az aszimmetrikus környezetben lévő (pl. gyűrűs)  $\text{CH}_2$  csoportoknál (ha a két H-mag kémiaiilag nem ekvivalens) már multiplicitást okoz a geminális csatolás és a  ${}^2J$  csatolási állandó értéke megkapható a spektrumból.

Az elméleti számításokkal is alátámasztott tapasztalat szerint  ${}^2J$  nagysága a vegyértékszög növekedésével többnyire párhuzamosan csökken: nyíltláncú telített és ciklohexán-vegyületekben ( $\varphi = 109^\circ$ ) 12-18 Hz, ciklopropánokban ( $\varphi = 114^\circ$ ) 4-9 Hz,  $=\text{CH}_2$  csoportokban ( $\varphi = 120^\circ$ ) pedig  $\sim 2$  Hz. A közös szénatomhoz kapcsolódó elektronszívó szubsztituensek csökkentik  ${}^2J$  nagyságát: metánra 12,5 Hz, míg a  $\text{CH}_3\text{F}$  molekulában 9,5 Hz. A szomszédos  $\pi$ -kötések növelik  ${}^2J$  értékét, pl. a malonsavdinitrilre 20,3 Hz-et mértek. Merev molekulákban a szomszédos  $\pi$ -kötés és a  $\text{CH}_2$  csoportbeli C–H  $\sigma$ -kötések diéderes szögének függvénye  ${}^2J$  nagysága, 30 Hz körüli maximummal.

#### 10.1.5.2.2. Vicinális ${}^3J(\text{H,H})$ csatolások

A térszerkezet meghatározásához a vicinális  ${}^3J(\text{H,H})$  csatolások a legfontosabbak. Az ún. Karplus-reláció (10.14) felismerése,<sup>9</sup> amely

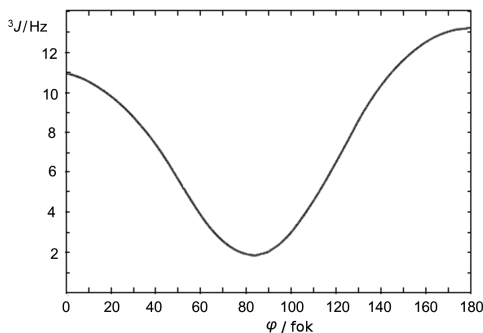
összefüggés a  $^3J$  csatolási állandók nagysága és a  $\phi$  diéderes szög közötti kapcsolatot írja le (10.22. ábra), forradalmasította a sztereokémiát.

$$^3J(\text{H,H}) = A + B \cdot \cos \phi + C \cdot \cos^2 \phi \quad (10.14)$$

10.8. táblázat. Jellegzetes homo- és heteronukleáris csatolási állandók / Hz

Funkciós csoport	Csatolási állandó		Funkciós csoport	Csatolási állandó	
	típusa	nagysága		típusa	nagysága
H <sub>2</sub>	$^1J(\text{H,H})$	280*	ciklopentánok	$^3J(\text{H,H})$	4–5
CH <sub>4</sub>	$^2J(\text{H,H})$	12,5*	ciklohexánok	$^3J(ax,ax)$	8–12
>CH <sub>2</sub>		10–18		$^3J(ax,eq)$	3–5
CH <sub>2</sub> (ciklopropán)		3–9		$^3J(eq,eq)$	2–3
CH <sub>2</sub> (oxirán)		4–7	>CH–CHO		1–3
CH <sub>2</sub> (aziridin)		1–2	–CH=CH–	$^3J(\text{H,H})^{cis}$	5–14
CH <sub>2</sub> (tiirán)		< 1		$^3J(\text{H,H})^{trans}$	12–19
=CH <sub>2</sub>		0–4	>CH–CH=	$^3J(\text{H,H})$	4–10
N=CH <sub>2</sub>		7–17	=CH–CH=		9–13
O=CH <sub>2</sub>		42*	=CH–CHO		5–8
CH <sub>3</sub> –CH <sub>3</sub>		8*	>CH–OH		~ 5
>CH–CH<	$^3J(\text{H,H})$	6–7**	HC≡CH		9,8*
CH–CH (ciklopropán)	$^3J(\text{H,H})^{cis}$	7–13	>CH–C≡CH		2–3
	$^3J(\text{H,H})^{trans}$	4–10	>CH–C=CH–	$^4J(\text{H,H})$	0–2
CH–CH (oxirán)	$^3J(\text{H,H})^{cis}$	2–5	–CH=C=CH–		5–6
	$^3J(\text{H,H})^{trans}$	1–3	–CH–C=CH–	$^4J(\text{H,H})^{cisoid}$	< 2 <sup>§</sup>
CH–CH (aziridin)	$^3J(\text{H,H})^{cis}$	~ 6	–CH–C=C–CH–	$^5J(\text{H,H})^{cisoid}$	1–2 <sup>#</sup>
	$^3J(\text{H,H})^{trans}$	~ 3	benzolgyűrűs vegyületek	$^3J(\text{H,H})^{orto}$	7– 10
CH–CH (tiirán)	$^3J(\text{H,H})^{cis}$	6–7		$^4J(\text{H,H})^{meta}$	1–3
	$^3J(\text{H,H})^{trans}$	5–6		$^5J(\text{H,H})^{para}$	< 1,5
>CHF	$^2J(\text{F,H})$	40–80	B–H	$^1J(\text{B,H})$	30–150
>CH–CF<	$^3J(\text{F,H})$	5–20	<sup>13</sup> C–H	$^1J(\text{C,H})^\dagger$	120–250
>CH–C(sp <sup>2</sup> )–CF<	$^4J(\text{F,H})$	0–5	<sup>15</sup> N–H	$^1J(\text{N,H})$	50–100
=CHF	$^2J(\text{F,H})$	70–90	<sup>31</sup> P–H	$^1J(\text{P,H})$	200–500
–CH=CF–	$^3J(\text{F,H})^{cis}$	10–60	O=P–H		500–700
	$^3J(\text{F,H})^{trans}$	110–130	<sup>13</sup> C–F	$^1J(\text{C,F})$	220–350
fluorszubsztituált benzolszám.	$^3J(\text{F,H})^{orto}$	17–21	<sup>13</sup> C– <sup>13</sup> C	$^1J(\text{C,C})$	30–60
	$^4J(\text{F,H})^{meta}$	2–4	<sup>13</sup> C= <sup>13</sup> C		~ 70
	$^5J(\text{F,H})^{para}$	12–15	<sup>13</sup> C≡ <sup>13</sup> C		~ 170
B–F	$^1J(\text{B,F})$	10–80	<sup>29</sup> Si–F	$^1J(\text{Si,F})$	350–500

\*Parciálisan deuterált származékból meghatározva; \*\*Gátolt rotáció esetén a diéderes szögtől függően 2–9 Hz; § $|^4J_{cisoid}| > |^4J_{transoid}|$ ; # $^5J(\text{H,H})^{transoid} \sim 0$ ;  $^\dagger\text{C}(sp^2) \sim 125$  Hz,  $\text{C}(sp^2) \sim 170$  Hz,  $\text{C}(sp) \sim 250$  Hz.

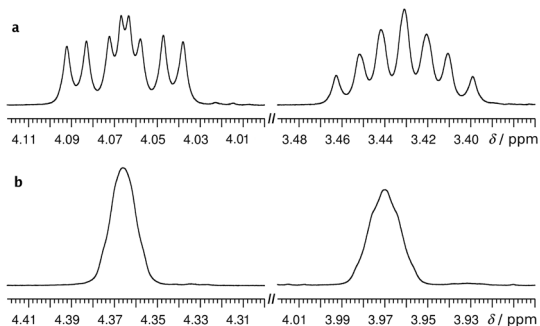
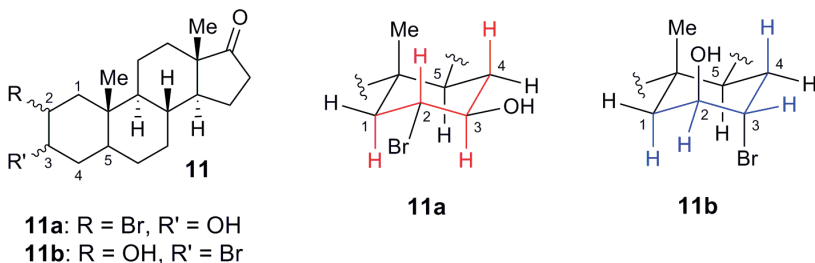


10.22. ábra. Karplus-reláció: a  ${}^3J(\text{H},\text{H})$  csatolási állandó függése a diéderes szögtől

A kvalitatív érvényű ( $A$ ,  $B$  és  $C$  tapasztalati értékű konstansok) összefüggés alkalmas pl. a telített hattagú gyűrűs vegyületek gyűrű-izomerjeinek vagy a geometriai izomerek megkülönböztetésére. A (10.14) összefüggés értelmében a vicinális csatolásoknak minimuma van  $90^\circ$ -os diéderes szög esetén és két eltérő nagyságú maximuma a  $\phi$   $0^\circ$  és  $180^\circ$  körüli értékeire (utóbbi esetben  ${}^3J$  nagyobb). A Karplus-összefüggés egyik továbbfejlesztése a szénatomok szubsztituenseinek elektronegativitását is figyelembe veszi.<sup>9c</sup>

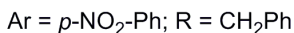
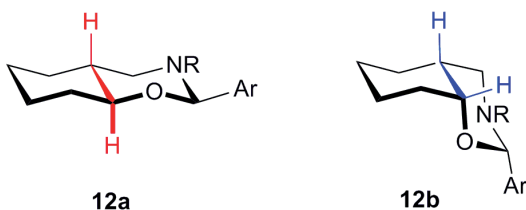
A ciklohexánokra és élettanilag fontos (hetero)analógjaikra (szénhidrátok, szteroidok) – összhangban a Karplus-relációval – jellegzetes a  $J(ax,ax) \gg J(ax,eq) \geq J(eq,eq)$  viszony és kevés kivétellel érvényes, hogy  $\delta H_{ax} < \delta H_{eq}$ , ahol  $\Delta\delta(\text{Hax},\text{Heq}) \approx 0,6$  ppm. E két tapasztalati szabály lehetővé teszi szubsztituensek térállásának meghatározását és gyűrűizomerek, illetve konformerek megkülönböztetését. A *diaxiális* és a jóval kisebb *diekvatoriális*, illetve *axiális-ekvatoriális* csatolási állandókra jellemző intervallumok a ciklohexánszármazékokban 4,5–12,5 és 2,0–4,5 Hz; a szénhidrátoknál 6,0–10,0 és 2,0–4,0 Hz; míg szteroidok esetén 7,5–14,0 és 1,0–7,5 Hz.

A nagy csatolási állandó *axiális-axiális* elhelyezkedésű hidrogénpár esetén sokszor egyszerűen megállapíthatóvá teszi a szubsztituensek térállását merev ciklohexángyűrűs vegyületekben, pl. szteroidokban. A 10.23. ábrán egy szteroid (**11**) 2-es és 3-as helyzetű szubsztituenseinek térállását egyértelműen jelzi, hogy **11a** mindkét geminális protonja két-két axiális szomszédal csatolódik, azaz a szubsztituensek *ekvatoriális* állásúak kell, hogy legyenek. A **11b** molekulában pedig egyik metinjel sem utal 10 Hz körüli *diaxiális* csatolásra, tehát mindkét hidrogén *ekvatoriális* és így R és R' *axiálisak*.



10.23. ábra. A **11a** (a) és **11b** (b) molekulák  $^1\text{H}$  NMR-spektrumának részlete a H-2 és H-3 atomok jelével

Ahogy a **11b** spektrumban is látható, gyakran nem válnak szét a multipliett egymáshoz közeli vonalai, de az egybeolvadt jel szélessége is elegendő lehet a csatolások nagyságának, s ezzel a konfigurációk és/vagy konformációk tisztázásához. Például a **12a** és **12b** szerkezeti izomerekben az oxigénnel szomszédos anellációs-H jelszélessége  $\sim 30$ , illetve  $\sim 6$  Hz, a **12a** esetén jóval nagyobb *diaxiális* csatolásnak megfelelően ( $\phi \approx 180^\circ$ ). A **12b** izomerben az *ekvatoriális-axiális* csatolás ui. a  $60^\circ$  körüli diéderes szög miatt sokkal kisebb.<sup>10</sup>



A cikloolefinek CH=CH csoportbeli *cisz*-helyzetű hidrogénjeinek  $^3J$  csatolása a 3-6 gyűrűtagszámú sorozatban fokozatosan növekszik (0,5-2,0; 2,5-4,0; 5,0-7,0 és 8,5-10,5 Hz), ami arra utal, hogy a diéderes szög mellett egyéb tényezőktől (itt a vegyértékszögtől) is függ a  $^3J$  csatolások nagysága.



10.9. táblázat. Vinilszármazékok  $^1\text{H}$  NMR kémiai eltolódása / ppm és csatolási állandói / Hz

szubsztituens	$\delta\text{H}_{\text{gem}}$	$\delta\text{H}_{\text{cisz}}$	$\delta\text{H}_{\text{transz}}$	$J_{\text{gem}}$	$J_{\text{cisz}}$	$J_{\text{transz}}$
-Li	5,3*	5,4*	5,1*	23,9	19,3	7,1
-CN	5,46	5,94	5,81	18,3	12,1	0,8
-Me	5,73	4,96	4,88	16,8	10,0	2,1
-F	5,84	3,92	3,62	12,7	4-7	-3,2
-COOH	5,89	6,20	5,71	15,4	9,7	0,8
-OMe	6,21	3,93	3,74	14,0	6,7	-2,0
-Cl	6,26	5,48	5,39	14,3	7,4	-1,5
-Br	6,36	5,75	5,83	15,5	7,1	-2,0
-Ac	6,63	6,52	6,11	17,8	10,8	1,1
-Ph	6,64	5,65	5,15	17,6	10,6	1,1
-NO <sub>2</sub>	6,81	6,16	5,61	15,0	7,6	2,0
-OAc	7,07	4,63	4,35	13,6	6,6	-1,6

\*számított adatok

A ciklopropánoknál, a (10.14) egyenlettel összhangban, a  $J^{\text{cisz}}$  ( $\phi = 0^\circ$ ) >  $J^{\text{transz}}$  ( $\phi = 144^\circ$ ) arány kivétel nélkül fennáll ( $J^{\text{cisz}}$ : 7-13 Hz,  $J^{\text{transz}}$ : 4-10 Hz), ugyanúgy, mint az oxiránoknál (2-5 és 1-3 Hz), de feltűnő, hogy az utóbbi esetben jóval kisebbek az értékek. Nyilvánvalóan az oxigén elektronegatív hatása felelős a kisebb  $^3J$  csatolásokért, mintegy elvonva a

10.10. táblázat. A gyűrűhidrogének  $^1\text{H}$  NMR kémiai eltolódástartományai / ppm és csatolási állandói / Hz az öttagú heterociklusos vegyületekben

	furán	tiofén	pirrol*
$\delta\text{H}-2$	6,8–8,6	6,0–8,5	6,3–7,5
$\delta\text{H}-3$	4,8–7,8	6,0–8,0	5,5–7,2
$\delta\text{H}-4$	5,8–7,0	6,5–7,8	5,5–6,6
$\delta\text{H}-5$	6,5–8,5	5,8–8,0	6,3–7,2
$J_{2,3}$	1,8–2,0	4,5–6,0	2,4–3,1
$J_{2,4}$	0,7–1,2	1,0–2,0	1,3–1,5
$J_{2,5}$	1,3–1,5	2,5–3,2	1,9–2,2
$J_{3,4}$	3,2–3,8	3,0–4,6	3,4–3,8

\* $J_{1,2}(\text{NH},\text{CH})$ : 2,3–3,0;  $J_{1,3}(\text{NH},\text{CH})$ : 2,0–2,7

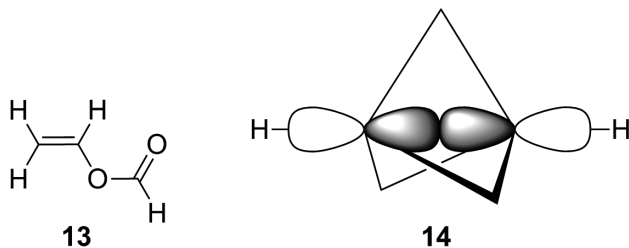
kölcsönhatást közvetítő elektronokat. Hasonlóképpen a  $C_2H_6$ ,  $C_2H_5Cl$  és  $CH_2Cl-CHCl_2$  molekulákra mért  $^3J$ -értékek: kb. 8, 7 és 6 Hz.

A 10.9. és 10.10. táblázatokban vinilszármazékok és öttagú heteroaromás vegyületek  $^1H$  NMR kémiai eltolódásai és H,H-csatolási állandói találhatók meg.

### 10.1.5.2.3. Távolható (long-range) $^nJ(H,H)$ csatolások ( $n \geq 4$ )

A csatolások nagysága rohamosan csökken a kölcsönható magokat elválasztó kötések számával. H,H-csatolások esetén 5-nél több kötésen át csak kivételesen jelentkeznek a rutin felvételeken észlelhető felhasadást okozó csatolások. A 3 Hz-nél általában kisebb  $^4J$  allil- és  $^5J$  homoallil-csatolások főként telítetlen vegyületekben lépnek fel és annál nagyobbak, minél nagyobb a (kölcsönhatást közvetítő)  $\sigma$ - és  $\pi$ -elektronfelhők átlapolása. Emiatt ezek a csatolási állandók gyakran hőmérsékletfüggők: a konformációs viszonyok megváltoztatják az elektronfelhők átlapolását. A csatolások függése a hőmérséklettől vagy más felvételi körülményektől a molekula flexibilitását jelzi (vö. 10.1.9. pont). Telített vegyületekben ritka a felhasadást okozó távolható csatolás és elsősorban merev molekulákban, a zezugos (W-típusú) elrendeződésű H-atomok közötti kölcsönhatás figyelhető meg.

A  $\pi$ -elektronok közvetítő szerepe magyarázza, hogy a hosszú konjugált láncokat tartalmazó molekulákban távolabbi protonok között is van jól észlelhető felhasadást kiváltó csatolás. A vinyl-formiát (**13**)  $^5J(H,H)$  csatolásai (1,7 és 0,8 Hz) jól példázzák ezt. A formilproton jelének nagyobb felhasadását a kedvező rotamerben a vele W-típusú csatolásba lépő *transz*-etilidén-H okozza.



A benzolszármazékokra jellemző a  $J^{orto}$  (7 - 9 Hz)  $> J^{meta}$  (2 - 3 Hz)  $> J^{para}$  ( $\leq 1$  Hz) viszony, valamint az, hogy a  $J$ -értékeket csak kis mértékben befolyásolják a szubsztituensek.

Ha az elektronfelhők szterikus okokból kényszerűen átlapolnak, ún. *téren át ható* (through space) kölcsönhatások révén rendhagyóan nagy

csatolási állandók mérhetők. Például a **14** biciklopentánok anellációs hidrogénjeire  $^4J \approx 18$  Hz.<sup>11</sup>

### 10.1.6. <sup>13</sup>C NMR-spektrumok. Jellegzetes széneltolódások, s az ezeket meghatározó szerkezeti tulajdonságok<sup>12-14</sup>

A <sup>13</sup>C izotóp 1%-os gyakorisága a természetes izotópkeverékben és a protonénál jóval kisebb mágneses momentuma miatt NMR-érzékenysége nagyságrendekkel (kb. 6500-szer) kisebb, mint az <sup>1</sup>H-izotópé. Ezért elfogadható minőségű jel/zaj viszonytal csak az 1970-es évektől lehetett <sup>13</sup>C NMR-spektrumokat mérni, amikor a megnövekedett memóriakapacitású számítógép-vezérelt, pulzuserjesztést és Fourier-transzformációs adatfeldolgozást alkalmazó kommersz műszerek elterjedtek.

A <sup>13</sup>C NMR-spektrumok hasznos információkkal bővíthetik a kémiai szerkezetről az <sup>1</sup>H NMR-felvételekből leszűrhető ismereteket. Szerkezetük egyszerűbb, részben a szénatomok kisebb számának, főként azonban a spin-spin csatolások okozta finomszerkezet hiányának köszönhetően, mely utóbbi a rutinfelvételeken a 10.1.8. pontban leírtak miatt nem jelentkezik. (Mivel tehát nincsenek multiplettek, a <sup>13</sup>C NMR-felvételek vonalas spektrumok!) A nagyságrenddel nagyobb kémiai eltolódástartomány a vonalak nagyobb szeparálódását és ezért könnyebb, biztonságosabb jelhozzárendelést tesz lehetővé. A <sup>13</sup>C NMR-spektrumok olyan funkciós csoportok, szerkezeti részletek jelenlétét is jelzik, amelyekben nincsenek H-atomok. A különböző hatások (térgátlás, szubsztituenseffektusok stb.) a molekulavázatot alkotó szénatomokra közvetlenebbül hatnak, s így könnyebben észlelhetők, mint a molekulák periferiáján elhelyezkedő hidrogének esetében.

A szénmagok kémiai eltolódását döntően hibridállapotuk és rendőségük határozza meg. Az <sup>1</sup>H NMR-spektroszkópiában tapasztaltakkal analógiában a  $\delta\text{CH}(sp^3) < \delta\text{CH}(sp) < \delta\text{CH}(sp^2)$  sorrend adódik a széneltolódásokra is: az etán-, acetilén- és etilén-szenek kémiai eltolódása: 5,7; 71,9 és 122,1 ppm. Mivel a  $\sigma$ -kötések elektrongerjesztési energiája a rendűséggel csökken és a  $\sigma^p$ -hozzájárulás ezzel fordítottan arányos, a primer, szekunder, terciér és kvaterner szenek kémiai eltolódása ebben a sorrendben növekszik (vö. 10.1.5.1.2. pont). Például az 1,2-dibróm-2-metilpropán (Me<sub>2</sub>CBr-CH<sub>2</sub>Br) eltolódásai:  $\delta(\text{CH}_3)$ : 31,8;  $\delta(\text{CH}_2)$ : 44,6 és  $\delta(\text{C}_{\text{kvat}})$ : 61,7 ppm.

Adott szénatom *szomszédjainak rendűsége* is jelentős befolyást gyakorol e szén kémiai eltolódására ( $\beta$ -effektus<sup>13</sup>, lásd alább). Elágazó láncú telített szénhidrogénekben érvényes a (10.15) additivitási szabály:

$$\delta C = A_a + \sum \beta_b B_{ab} + \gamma C_a + \delta D_a, \quad (10.15)$$

ahol  $a$  a szomszédos szénatomok száma (a vizsgált szénatom rendűsége),  $b$  a szomszéd szén rendűsége,  $\beta$  az azonos rendű szomszédok száma,  $\gamma$  és  $\delta$  a 3-, illetve 4-kötésnyi távolságban lévő szénatomok száma;  $A$ ,  $B$ ,  $C$  és  $D$  pedig konstansok (10.11. táblázat). A táblázat adataiból következik, hogy egy olyan másodrendű szén, amelynek van egy kvaterner szomszédja, nagyobb eltolódású, mint egy kvaterner szén, amelyhez négy primer helyettesítő kapcsolódik. Például a  $\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-CMe}_2$  molekula metilénszenének eltolódása 36,5 ppm, míg a neopentán ( $\text{CMe}_4$ ) kvaterner szénatomjáié csak 27,4 ppm.

10.11. táblázat. Konstansok telített szénhidrogének <sup>13</sup>C NMR kémiai eltolódásának (ppm) számításához ( $a$  és  $b$  jelentését lásd a szövegben)

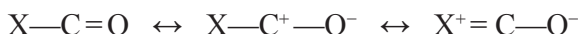
konstansok	a szénatom rendűsége				
	$a = 1$	$a = 2$	$a = 3$	$a = 4$	
$A$	6,80	15,34	23,46	27,77	
$B$	$b = 2$	9,56	9,75	6,60	2,26
	$b = 3$	17,83	16,70	11,14	3,96
	$b = 4$	25,48	21,43	14,70	7,35
$C$		-2,99	-2,69	-2,07	0,68
$D$		0,49	0,25		

Bár az <sup>1</sup>H NMR-eltolódásokat megszabó hozzájárulások közül a szénmagokra a paramágneses komponens a meghatározó, amely nagyságrenddel nagyobb mértékben hat a  $\delta$ -értékekre, mint a  $\sigma^d$  komponens, a csökkenő elektronsűrűség kémiai eltolódást növelő hatása itt is érvényes (vö. 10.1.5.1.1. pont). Jól szemléltetik ezt a 10.4. és 10.5. táblázatok, vagy például a metil-halogenidek <sup>13</sup>C NMR-eltolódásai (10.14. táblázat). Adott szénatomhoz kapcsolódó különböző szubsztituensek tehát -I effektusuk nagyságával arányosan növelik a  $\delta C$ -értéket ( $\alpha$ -effektus<sup>13</sup>). A szénmag körüli elektronsűrűség szélsőséges csökkenése a karbéniumkationokban eredményezi a legnagyobb széneltolódásokat (~330 ppm).

A 10.12. táblázat monoszubsztituált ciklohexánszármazékok <sup>13</sup>C NMR kémiai eltolódásait tartalmazza. A szubsztituált szén eltolódástartományja igen tág (> 60 ppm) és az alapvegyületre mért  $\delta C$ -érték nagyjából

a szubsztituens  $-I$  effektusával párhuzamos nő a származékokban ( $\alpha$ -effektus<sup>13</sup>). A szomszéd szén kémiai eltolódása jelentősen nő (átlag 6,5 ppm-el) és csak kisebb mértékben ( $\sim 10$  ppm-es tartományban) ingadozik. Ez azt jelenti, hogy a tercier  $\delta C$ -értéket döntően az  $\alpha$ -szén rendűsége határozza meg ( $\beta$ -effektus<sup>13</sup>). A  $\gamma$ - és  $\delta$ -helyzetű gyűrűs szenek eltolódását csak csekély mértékben ( $|\Delta\delta C| < 2$  ppm) befolyásolják a szubsztituensek és árnyékolásnövekedést okoznak, jelezve, hogy a téreffektus<sup>15</sup> (lásd alább) dominál a kémiai eltolódást megszabó tényezők között.

A szénatomok körüli elektronsűrűség meghatározó szerepe magyarázza, hogy a kötéspolarizáció, a mezoméria és minden egyéb, az elektroneloszlást befolyásoló tényező hat a <sup>13</sup>C kémiai eltolódásértékekre. Előbbi indokolja a karbonilszénvonalak nagy eltolódását (10.5. és 10.13. táblázat), a  $C^+—O^-$  határszerkezet előtérbe kerülése következtében. A mezoméria az oka annak, hogy az észterekben és amidokban a karbonilszén eltolódása jelentősen csökken a ketonokhoz képest, mivel a pozitív centrum ezeknél átvédődik a szénről a nemkötő elektronpárjával a mezomer rendszerben résztvevő heteroatomra (vö. 10.13. táblázat):



10.12. táblázat. Monoszubsztituált ciklohexánok <sup>13</sup>C NMR kémiai eltolódásai / ppm

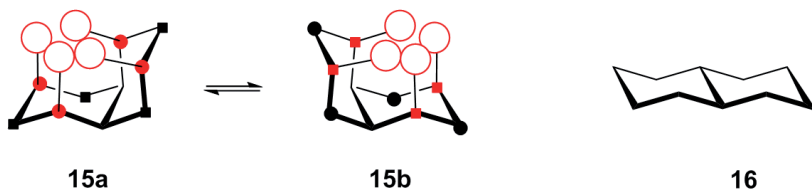
szubsztituens	$\delta C-1$	$\delta C-2$	$\delta C-3$	$\delta C-4$
-H		26,6		
-CN	28,3	30,1	24,6	25,8
-I	31,8	39,8	27,4	25,5
-Me	33,4	36,0	27,1	27,0
-SH	38,5	38,5	26,8	25,9
-COOMe	43,4	29,6	26,0	26,4
-Ph	45,1	34,9	27,4	26,7
-NH <sub>2</sub>	51,1	37,7	25,8	26,5
-Ac	51,5	29,0	26,6	26,3
-Br	52,6	37,9	26,1	25,6
-Cl	59,8	37,2	25,2	25,6
-OH	70,0	36,0	25,0	26,4
-OAc	72,3	32,2	24,4	26,1
-OMe	78,6	32,3	24,3	26,7
-NO <sub>2</sub>	84,6	31,4	24,7	25,5
-F	90,5	33,1	23,5	26,0

10.13. táblázat. Karbonsavszármazékok  $^{13}\text{C}$  NMR kémiai eltolódása / ppm

R	H	Me	CMe <sub>3</sub>	CCl <sub>3</sub>	-CH=CH <sub>2</sub>	Ph
R-COMe	199,7	206,0	210,4	186,3	196,9	195,7
R-CHO	194,1	199,3	206,3	175,9	192,1	190,7
R-COOH	166,0	178,1	185,9	167,1	170,4	173,5
R-CONH <sub>2</sub>	165,5	172,7	180,9	162,7	168,3	169,7
R-COCl	166,0	169,0	180,3	162,6	165,6	168,7
R-COOMe	161,6	170,7	178,9	161,0	165,5	165,6
(R-CO) <sub>2</sub> O	156,0	166,1	173,9	154,1	156,3	162,8

A mezomer szerkezetek „könnyen változó/változtatható” elektroneloszlásával kapcsolatosak a karbonilvegyületeknél mért kimagaslóan nagy oldószereffektusok, melyek a más  $^{13}\text{C}$ -vonalakra jellegzetes 1-5 ppm-nél jóval nagyobbak (elérhetik akár a 40 ppm-et is). Az anizotróp szomszédcsoport-effektus ritkán jut jelentős szerephez, mivel változatlan nagysága (< 4 ppm) az  $^1\text{H}$  magokra jellemzőnél nagyobb eltolódástartományhoz képest (kb. 220 ppm a „normál” esetekben, míg a hidrogénekre ~16 ppm) rendszerint elhanyagolható.

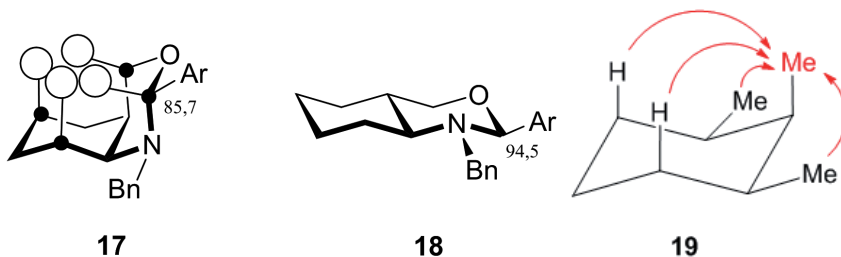
A heteroaromás rendszerek gyűrűt alkotó szénatomjainak kémiai eltolódását azonban jelentősen befolyásolják a köráramok. A furán – pirrol – tiofén sorban a delokalizáció (az aromás jelleg) erősödésével mérséklődik a C<sub>α</sub> (heteroatommal szomszédos) és C<sub>β</sub> szénatomok közötti (s a heteroatom -I effektusától származó) eltolódáskülönbség az egyenletesebb elektroneloszlás eredményeképpen:  $\Delta\delta(\text{C}_\alpha, \text{C}_\beta)$  értéke rendre 142,7-109,5 = 33,2 ppm; 118,4-108,0 = 10,4 ppm, valamint 124,4-126,2 = -1,8 ppm. (vö. 10.10. táblázat). Megjegyzendő, hogy a heteroatomok -I effektusa additív: az öttagú heteroaromás vegyületekben a két heteroatom közötti szén 150 ppm körüli vonalat adnak, a tetrazin jele pedig 162 ppm-nél jelentkezik.



Igen fontos és hasznos viszont az  $^1\text{H}$  NMR-spektroszkópiában nem létező ún.  $\gamma$ - (gauche-), vagy röviden *téreffektus* (steric compression shift, field effect),<sup>15</sup> mivel számos sztereokémiai probléma  $^{13}\text{C}$  NMR-adatokra épülő megoldásának kulcsául szolgál. A téreffektus az egymáshoz közeli

(mozgásukban gátolt) atomokat és csoportokat hordozó szénatomok kémiai eltolódáscsökkenését okozza, s ez a hatás elérheti akár a ~20 ppm-et is.

A *cisz*-dekalin (**15**)  $\alpha$ -,  $\beta$ - és  $\gamma$ -helyzetű szénatomjainak eltolódása rendre 7,2; 4,9 és 2,6 ppm-mel kisebb, mint a *transz*-izomerben (**16**), annak ellenére, hogy előbbiben a két preferált szék-szék konformáció egyensúlya (**15a**  $\rightleftharpoons$  **15b**) miatt az egyik konformerben (a képleteken „•” vagy „●” jelzett H-k kölcsönhatása révén) gátolt helyzetbe („•” jelű) kerülő szén a másikon a nem gátolt („●” jelű) pozícióban vannak, tehát átlagolás jelentkezik. Merev rendszereknél nagyobbak a téreffektusok. Így a **17** és **18** izomerekre pl.  $\Delta\delta(C_\gamma) = 8,8$  ppm, mert az *N*-Bn csoport nagy térigénye miatt a **15b**-vel analóg konformáció nem lehetséges.<sup>10</sup>



A téreffektusok additívak: a *cisz*-1,2,3-trimetilciklohexán (**19**) *axiális* 2-metilcsoportja négy kölcsönhatásban vesz részt (a két szomszédos metilcsoporttal és a két 1,3-helyzetű *axiális* hidrogénnel) és szénvonala 17,8 ppm-mel diamágnésesen eltolódva jelentkezik.

A téreffektusnak köszönhetően könnyen megkülönböztethetők pl. a gyűrűizomerek. Az 1,2-dimetilciklohexán *cisz* és *transz* izomerjeinek  $C_s$ ,  $C_\alpha$ ,  $C_\beta$  és  $CH_3$  atomjaira mért téreffektusok: 5,1; 4,5; 3,2 és 4,5 ppm, míg a ciklopentán analógokra 5,1; 1,8; 0,1 és 3,6 ppm.<sup>16</sup> Természetesen a kedvezőtlenebb térszerkezet következményeként a *cisz*-izomerek eltolódásai kisebbek. Az utóbbi izomerpárnál kisebbek az effektusok, ui. az öttagú gyűrűhöz kapcsolódó metilcsoportok messzebb vannak egymástól. Többszörösen szubsztituált vagy kondenzált származékoknál előfordulhat, hogy még kisebbek a különbségek, sőt egyes szénekre akár zérus vagy fordított is lehet. A gyűrűs szének összeltolódása azonban mindig kisebb a *cisz*-izomerekre. (A fenti két esetben a  $\Sigma \Delta\delta C$  érték 17,3, ill. 10,6 ppm).

A 10.14. táblázat a metil-halogenidek széneltolódásait tartalmazza. Látható, hogy a halogénatom növekvő elektronegativitása a kémiai eltolódások várt növekedését okozza. A szénhez kapcsolódó halogének számának növekedésével a fluor és klór esetén ugyancsak ez a várt tendencia tapasztalható. A brómmal – és különösen jóddal – többszörösen

szubsztituált szenek kiugró árnyékoltságát az okozza, hogy a –I effektust az ún. *nehézatom-effektus* ellensúlyozza, illetve túlkompenzálja. Utóbbi hatás magyarázza, hogy a  $\text{Cl}_4$  molekula  $-292,5$  ppm-es vonala a mért legnagyobb negatív  $\delta\text{C}$ -érték.

10.14. táblázat. A metán halogénszármazékainak  $^{13}\text{C}$  NMR kémiai eltolódása / ppm

X	$\text{CH}_3\text{X}$	$\text{CH}_2\text{X}_2$	$\text{CHX}_3$	$\text{CX}_4$
F	75,2	109,0	116,4	118,5
Cl	25,1	54,2	77,7	96,7
Br	10,2	21,6	12,3	-25,5
I	-20,5	-53,8	-139,7	-292,5

A 10.15. táblázatban alkoholok, éterek és ecetsavészterek  $^{13}\text{C}$  NMR-adatai találhatóak. Látható az oxigénatomok –I effektusának a kémiai eltolódást jelentősen növelő hatása és additivitása.

10.15. táblázat. Telített, nyíltláncú alkoholok, éterek és ecetsavészterek  $^{13}\text{C}$  NMR kémiai eltolódása / ppm

R	metil	etil		<i>n</i> -propil			$\text{CH}_n\text{OMe}_{4-n}$ ( $n = 2, 1, 0$ )	
		$\text{CH}_2$	$\text{CH}_3$	$\text{OCH}_2$	$\text{CCH}_2\text{C}$	$\text{CH}_3$	$\text{CH}_n$	$\text{OCH}_3$
R–OH	49,0	57,0	17,6	63,6	25,8	10,0	97,9	54,8
R–O–R	59,7	67,7	14,7	73,2	24,0	11,1	115,0	51,1
R–COOMe	50,7	59,8	13,8	66,1	22,4	10,5	125,6	–

Speciális esetekben néhány kisebb jelentőségű további tényező (pl. van der Waals-kölcsönhatás, oldószereffektus) is befolyásolhatja a széneltolódásokat. Ezek közül az izotópeffektus érdemel említést, amelyet asszignációs, ritkábban szerkezetkutatói kérdések tisztázására is felhasználható. A H→D csere 0-1,5 ppm közötti eltolódáscsökkenésekkel jár a perdeuterált vegyületekben.

A  $^{13}\text{C}$  NMR-eltolódások különösen fontosak a hidrogéneket nem tartalmazó funkciós csoportok azonosításához. A MeCN, MeNC, MeNCO és MeNCS molekulák  $^1\text{H}$  NMR metiljele az acetonitrilt kivéve alig tér el (0,3; 29,3; 26,1 és 29,1 ppm), de a telítetlen szenek jellegzetes eltolódása (158,5; 121,3 és 128,5 ppm) megkönnyíti a szerkezetfelderítést. A 0,3 ppm-es jel más funkciós csoportoktól is származhatna (pl. fém- és jódvegyületek, ciklopropánok), de a C(*sp*)-vonallal (117,7 ppm) együtt viszont bizonyító erejű. Az izocianát szénvonalának nagy eltoló-



dását a szén pozitív polarizációja indokolja, hasonlóan a szén-dioxidhoz (182,2 ppm; CO<sub>2</sub>: 124,2 ppm).

Hasonlóképpen az allének és acetilének <sup>13</sup>C NMR-adatai is perdöntőek lehetnek a szerkezetek igazolásában. Az allének középső szénatomjának vonala a 200-215 ppm-es tartományban van, míg a szélsőké legtöbbször az acetilénszenekre is jellemző 60–95 ppm-es intervallumban jelentkeznek. Az acetilén jele 71,9 ppm-nél, míg az allén két vonala 74,8 és 213,5 ppm-nél lép föl.

### 10.1.7. Kettősrezonancia

Nem sokkal az első sikeres rezonanciakísérleteket követően, a méréstechnika fejlődésének köszönhetően kiderült (Hahn és Gutowsky, 1952), hogy az <sup>1</sup>H NMR-spektrumoknak finomszerkezete van. A spin-spin kölcsönhatások következtében fellépő multiplettekből megkaphatók a *J* csatolási állandók. A jelenség hátránya a bonyolultabb, gyakran egymással átfedő multiplettekből álló spektrumszerkezet, előnye, hogy az ezekből megkapható *J*-értékek további fontos információforrást jelentenek a kémiai szerkezetfelderítés számára.

Anderson és Freeman 1961-ben egy olyan egyszerű kiegészítő méréstechnika alkalmazását írta le, amellyel megszüntethetők a spin-spin kölcsönhatások okozta jelfelhasadások: lényegesen egyszerűsíthetők a spektrumok.<sup>17</sup> Ez az ún. *lecsatolás* mára a kettős- és többszörös rezonancia módszerek egész arzenáljának kiinduló pontjává vált, amelyek felvételtechnikai problémák megoldását (a spektrumok egyszerűsítésén túl pl. a jel/zaj viszony javítását), elméleti kérdések tisztázását (pl. a csatolási állandók előjelének meghatározását, átmenetek adott kvantumállapotokhoz való hozzárendelését) és szerkezetfelderítési kérdések megoldását (pl. gyenge vagy fedett jelek azonosítását, stb.) teszik lehetővé.

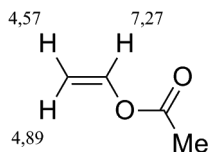
A ma is használatos kettősrezonancia-mérések legtöbbje pulzus-szekvenciák alkalmazására épül. Ide sorolhatók pl. a homonukleáris multiplett- és sávselektív, szélessávú heteronukleáris és kapuzott lecsatolások, a „spin-tickling” („csiklandozás”),<sup>2a</sup> a NOE-mérések (10.1.8. pont) bizonyos formái, polarizációátviteli és telítésátviteli kísérletek, az ún. Hartmann—Hahn-módszerek, off-rezonancia lecsatolások, stb. Ezek közül itt csak a szelektív proton-proton lecsatolást és a <sup>13</sup>C NMR-mérésekben alkalmazott szélessávú protonlecsatolást vázoljuk.

A *szelektív* proton-proton (homonukleáris) *lecsatolás* (azaz egy kiválasztott skaláris spin-spin csatolás megfelelő gerjesztési technikával

való megszüntetése) ma már ritkábban használatos módszer (a 10.3.3.1. pontban tárgyalt COSY mai formája, illetve ennek változatai igen gyors és hatékony alternatívát kínálnak), de elvi és tudománytörténeti jelentőségére, valamint a bonyolultabb kettősrezonancia-technikák könnyebb megértése érdekében lényegét röviden ismertetjük.

Nagyon leegyszerűsítve, a lecsatolás a szokásos  $B_1$  gerjesztő tér mellett egy második, monokromatikus  $B_2$  tér alkalmazását jelenti (*kettősrezonancia*, *double resonance*, DR). (A többféle gerjesztőfrekvencia alkalmazásának lehetőségét Bloch már 1954-ben felvetette, ami a többdimenziós NMR másfél évtizeddel későbbi ötletének csírájaként is felfogható.)

A legegyszerűbb AX spinrendszer esetén pl. ha  $\nu_X$  frekvenciájú  $B_2$  térrel folyamatosan besugározzuk az X mag jelét, akkor az X magon indukált gyors  $\beta \rightleftharpoons \alpha$  átmenetek miatt a kvantumállapotok átlagélettartama olyan mértékben lerövidül, hogy az A mag már nem képes „megkülönböztetni” az X mag  $\alpha$  és  $\beta$  nívóit. Így az A magnak a 10.12. ábrán bemutatott dublett felhasadása megszűnik és a jele szinguletté válik, más szóval az X magot „lecsatoltuk” az A magról. Ily módon nemcsak a spektrumszerkezet egyszerűsödik, de a besugárzott jelű mag kölcsönható partnerei (ezek jelei) is azonosíthatók.

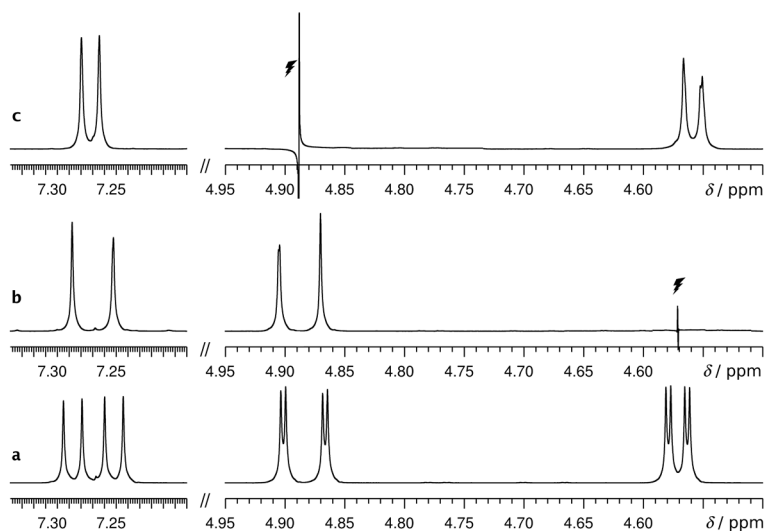


## 20

Szemléltetésül a vinil-acetát (**20**)  $^1\text{H}$  NMR-spektrum részlete (10.24/a. ábra) szolgál. A 7,27 ppm-nél jelentkező olefinproton jel kettős dublett felhasadását (14,0, illetve 6,3 Hz csatolási állandókkal) a szomszédos  $=\text{CH}_2$  protonok okozzák. Közülük a 4,57 ppm-nél jelentkező jelet telítve (10.24/b. ábra) a 6,3 Hz-es felhasadást szüntetjük meg (14,0 Hz-es dublett marad 7,27 ppm-nél), míg a *transz*-állású partnert hasonló módon lecsatolva (10.24/c. ábra) a 14,0 Hz-es csatolás szűnik meg. A terminális  $=\text{CH}_2$  protonok jelének besugárzása egyúttal a kettőjük spin-spin kölcsönhatását jellemző 1,6 Hz-es csatolás megszűnését is eredményezi, mindkettő jelét (közel) dubletté egyszerűsítve.

A kettősrezonancia ún. *szélessávú* (broad band, BB) formáját ma is rutinszerűen alkalmazzuk a heteronukleáris NMR-spektroszkópiában, leginkább az egydimenziós  $^{13}\text{C}$  NMR-spektrumok felvételekor. Az 1D  $^{13}\text{C}$  NMR-spektrumok nyújtotta fő információ, hogy a vizsgált molekula hány

és milyen kémiai eltolódású  $^{13}\text{C}$ -jelet ad, s a jeleket adó szénatomokhoz hány proton kapcsolódik közvetlenül (vagyis  $\text{CH}_3$ ,  $\text{CH}_2$ ,  $\text{CH}$  vagy  $\text{C}$  csoportról van-e szó). Az egyszerű pulzusgerjesztéssel nyert  $^{13}\text{C}$  NMR-spektrumban azonban minden  $^{13}\text{C}$ -jel multipletté hasad a közvetlenül kapcsolódó, illetve néhány kötési távolságra lévő protonokkal való csatolások okán. A bonyolult, sokszor átfedő multiplettek nagymértékben megnehezítik a spektrumok interpretálását és a jefelhasadások sokkal rosszabb jel/zaj viszonyt eredményeznének. Ezért a spektrumokat rutinszerűen úgy regisztráljuk (ld. pl. 10.8. ábra), hogy a  $^{13}\text{C}$ -magok gerjesztése közben a protonokat egy olyan „széles sávú” RF besugárzással



10.24. ábra. A vinil-acetát (**20**) 400 MHz-es  $^1\text{H}$  NMR-spektruma (a) és a lecsatolásokról készült felvételek (b, c)

gerjesztjük, amelynek segítségével a teljes  $\Delta\delta\text{H}$  kémiai eltolódástartományt lecsatoljuk. Így a  $^{13}\text{C}$ -rezonanciajeleknek megszűnik a finomszerkezete [kivéve, ha a szén a protonokon kívül más mágneses magokkal (pl.  $^{19}\text{F}$ , vagy  $^{31}\text{P}$ , stb.) is csatolódnak – a homonukleáris  $^{13}\text{C}$ -csatolások valószínűsége igen kicsiny, s ezért nem okoznak észrevehető felhasadásokat]. A szélesávú protonlecsatolás további előnye, hogy a NOE (ld. 10.1.8. pont) a  $^{13}\text{C}$ -jelek további intenzitásnövekedését eredményezi, így lényegesen jobb minőségű és egyszerűbb szerkezetű, könnyebben értelmezhető  $^{13}\text{C}$  NMR-spektrumhoz jutunk. A jelek multiplicitásából származó információk fentiek értelmében a rutinspektrumokból ugyan hiányoznak, de más úton (ld. pl. 10.3.1. és 10.3.3. pontok) könnyen megszerezhetők.

### 10.1.8. A nukleáris Overhauser-effektus (NOE)<sup>18</sup>

A 10.1.3 pontban tárgyalt és a spektrumban jelfelhasadásokat okozó spin-spin kölcsönhatásokat (skaláris csatolás) a kémiai kötések közvetítik. A spin-spin kölcsönhatásoknak azonban létezik egy másik, a relaxációs jelenségekkel összefüggő útja, aminek nincsenek feltűnő (a jelek számát és elrendeződését megváltoztató) következményei a spektrumokban. Ez a kölcsönhatás a térben közeli ( $< 5 \text{ \AA}$  távolságú) spinek között létrejövő dipól-dipól kapcsolat, és egyik legfontosabb eredménye az ún. mag-Overhauser-effektus (nuclear Overhauser effect, NOE, nOe).<sup>19</sup>

Ha egy kétfajta spint (A és B) tartalmazó kismolekulákból álló rendszer A spinjeinek jelét folyamatos besugárzással telítjük (vö. 10.1.1. pont), akkor ennek hatására a B spinek rezonanciajelének intenzitása megnövekszik. Ez a jelenség a NOE. Az intenzitás-növekedés a kölcsönható magok távolságának hatodik(!) hatványával fordítottan arányos és az  $^1\text{H}$ ,  $^1\text{H}$  magpárra ideális esetben 50% is lehet.

A NOE elméleti értelmezése meglehetősen bonyolult, a jelenség létrejöttének okát érzékeltetendő ezért itt csak vázlatosan érintjük. A téren át egymást érzékelő A és B spinek között *keresztrelaxációs* hatás lép föl: az A spin átmenetei a B spint is kvantumállapot-változásra „készítetik”, így egymással szimultán átmenetek jönnek létre. Az eddig tárgyalt  $\alpha \rightarrow \beta$  és  $\beta \rightarrow \alpha$  átmenetek ún. *egykvantumos* átmenetek, mivel minden ilyen átmenetnél az  $m$  kvantumszám értéke eggyel változik meg ( $|\Delta m| = 1$ ). A kereszt-relaxáció során, ha az A spin  $\alpha_A \rightarrow \beta_A$  átmenete megy végbe, akkor ezzel párhuzamosan a B spin vagy szintén  $\alpha_B \rightarrow \beta_B$  (ekkor összességében  $\Delta m = 2$ ), vagy egy  $\beta_B \rightarrow \alpha_B$  (ekkor összességében  $\Delta m = 0$ ) átmenete játszódhat le. Ezeknek az ún. *kétkvantumos* vagy *zérókvantumos* átmeneteknek az eredményeként a két spin relaxációs *viszonyai* olyan módon változnak meg, hogy az A spin telítésének vagy inverziójának hatására a B spin energianívóinak populációkülönbsége megnövekszik, ami B rezonanciajelének intenzitásnövekedését eredményezi. (Megjegyzendő, hogy a NOE makromolekulák vagy igen viszkózus oldatok esetén intenzitáscsökkenést okoz).

A NOE az atom-atom távolságoknak a röntgendiffrakciós mérésekével összevethető pontosságú meghatározását teszi lehetővé. Segítségével sztereokémiai problémák oldhatók meg, de NOE-méréseken alapul a biomakromolekulák, elsősorban a fehérjék oldatbeli térszerkezetének és jelhozzárendelési problémáinak tisztázása is. (A NOE mérésének modern lehetőségeire a 10.3.2.2. és 10.3.3.5. pontban találhatók példák).

Mint ahogy már szó volt róla, a  $^{13}\text{C}$  NMR-rutinspektrumok a protonok egyidejű, szélessávú lecsatolásával készülnek. A hidrogénmagok gerjesztése a NOE következtében a szénjelek (szerencsés esetben közel háromszoros) intenzitásnövekedését okozza. A szélessávú lecsatolás így kettős előnnyel jár: az egyszerűbb vonalas spektrumszerkezet mellett a jel/zaj viszonyt is jelentősen javítja. Ugyanez az oka viszont annak, hogy a  $^{13}\text{C}$  NMR-spektrumokban nincs arányosság a jelintenzitás és a jelekhez tartozó szénatomok száma között, de alkalmas pulzusszekvencia felhasználásával mód van az „abszolút” (NOE-mentes) intenzitások mérésére is.

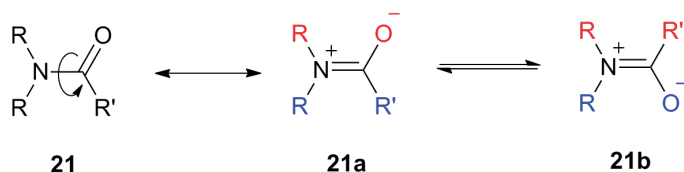
A NOE mérésének sokféle módszere van, amelyek alapvetően két kategóriába sorolhatók: az állandó állapotú (steady-state) és a tranziens NOE-mérésekre. Előbbi az A spin jelének folyamatos telítése mellett a B spinen kialakult NOE nagyságát méri, utóbbi az A spin jelén alkalmazott valamilyen lágy vagy kemény pulzust követően a B spinen megjelenő NOE felépülésének sebességéről ad információt. A NOE mérésének leginkább tradicionális módja a „steady-state” alapú *differencia-NOE* (*DIFFNOE* vagy *DNOE*) mérés, melynek során a normál spektrumot kivonjuk a NOE-t tartalmazóból, amelyet egy vagy több jel telítése közben regisztrálunk (ld. bővebben a 10.3.2.2. pontban). A mai gyakorlatban szinte kizárólag tranziens NOE-méréseket (1D NOESY: 10.3.2.2. pont, ill. 2D NOESY: 10.3.3.5. pont) alkalmaznak.

### **10.1.9. A molekuláris mozgások, a molekuladinamika hatása a spektrumokra – cserefolyamatok. DNMR- és VTNMR-spektroszkópia<sup>20</sup>**

A nem merev szerkezetű, flexibilis molekulák mozgásai látványosan befolyásolhatják az NMR-spektrumok szerkezetét: multiplicitás- és jelalakváltozásokat okozhatnak, akár még jelek eltűnését is eredményezhetnek. E jelenségek további, az NMR-mérésekből nyerhető információforrást képviselnek és kihasználhatók a szerkezetkutatásban és a méréstechnikában éppúgy, mint pl. a molekuláris mozgások kinetikai, termodinamikai paramétereinek kiszámításában. A molekuláris mozgások – a molekuladinamika – tanulmányozását szolgáló vizsgálatok elnevezése a *DNMR- (dinamikus NMR) spektroszkópia*.

Legelőször a *gátolt rotáció* hatását írták le az  $^1\text{H}$  NMR-spektrumra, a dimetil-nitrózamin esetén.<sup>21</sup> A savamidokban is tipikus forgási gátlás a

C–N kötésrend-növekedés következménye, amely a **21a,b** határszerkezetekkel jellemezhető mezomer rendszer kialakulásával értelmezhető:



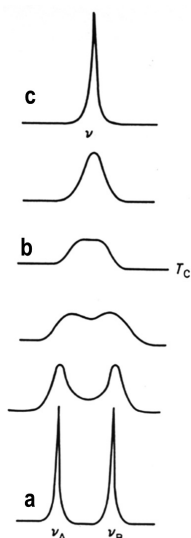
Ha  $R = \text{CH}_3$  és nincs forgás, vagy elég lassú a C–N kötés körül, a két metilcsoport szingulettje eltérő kémiai eltolódású jelet ad (10.25/a. ábra), mert pl. **21a**-ban egyikük ( $R$ ) *cisz*-, a másik ( $R$ ) *transz*-helyzetű az oxigénnel (illetve ellenkező helyzetű az  $R'$  csoporttal). Ha a forgás szabadon, s elég gyorsan végbemehet, akkor a metilhidrogének kémiai környezete „átlagolódik” és egybeeső jelet adnak (10.25/c. ábra), amelynek kémiai eltolódása az elkülönült jelekének a számtani közepe. (Ha a cserélődő állapotok előfordulási valószínűsége, populációja eltérő, akkor a súlyozott átlagnál lép föl az egybeolvadt jel.) Az „elég” kitétel itt az „NMR-időskálára” vonatkozik. Ha a jelek frekvenciakülönbsége  $\Delta\nu = \Delta\delta B_0$  [Hz] sokkal nagyobb, mint a csere folyamat  $k$  sebességi állandója, akkor elkülönülnek a jelek, ha viszont  $k \gg 2\pi \Delta\nu$ , akkor egyetlen éles jelet kapunk. E két szélső helyzet között átmenetet idézhetünk elő a hőmérséklet változtatásával: magasabb hőmérsékleten felgyorsulnak a csere folyamatok. Bármelyik szélső helyzet felől a másikhoz közelítve, a jelek fokozatosan növekvő mértékben kiszélesednek és egy adott hőmérsékleten (*koaleszcencia pont*) egybeolvadnak (10.25/b. ábra). Elméletileg levezethető, hogy ez – a tárgyalt legegyszerűbb esetben – a  $k = 2,22\Delta\nu$  állandóval jellemezhető csere sebességnél, illetve a cserélődő állapotok  $\tau = 1/k$  *átlagélettartama* esetén következik be. Természetesen minél nagyobb  $\Delta\nu$ , annál gyorsabb csere (rövidebb élettartam) szükséges a koaleszcencia, majd a közös jel eléréséhez, illetve megjelenéséhez. A  $T_c$  koaleszcencia-hőmérsékletből könnyen kiszámíthatók a csere folyamat termodinamikai paraméterei, az aktiválási energia (a mozgás potenciálgátja), ill. az aktiválási szabadentalpia.<sup>2a</sup>

A gyakorlatilag hozzáférhető hőmérséklet-tartományban ( $-150 \dots +200$  °C) olyan csere folyamatok tanulmányozhatók NMR-módszerrel, amelyeknél a cserélődő állapotok átlagélettartama  $1-10^{-3}$  s és  $\Delta G^\ddagger$  aktiválási szabadentalpiája  $\sim 25-100$  kJ/mól. Az NMR-spektumok hőmérsékletfüggésének tanulmányozását nevezzük *VT-(variable temperature-)* NMR-módszernek.

A leggyakoribb ide tartozó jelenség a mozgékony („savanyú”) hidrogének intramolekuláris, vagy azonos és különböző molekulák között egyaránt lehetséges intermolekuláris cseréje. Így pl. alkoholokra a csere az alábbi reakcióegyenlettel írható le (pseudoreakció):



Ha a cserefolyamat elég gyors, az R és R\* környezetben lévő OH-hidrogéneknek közös jelük van. A cseresebesség nemcsak a hőmérséklettől, de más vizsgálati körülményektől, pl. az oldószertől is függ. Trifluor-ecetsavban, DMSO- $d_6$  vagy DMF- $d_7$  oldatban pl. általában lassú a csere és a savanyú H-jelek elkülönülnek (ld. pl. 10.30. ábra). Vizes oldatban a feloldott vegyület összes mozgékony protonja az oldószerral közös jelet ad (ld. 10.35. ábra). (Ha a DMSO- $d_6$  víztartalma nagy – higroszkópos oldószer lévén gyakran ez a helyzet –, a savanyú hidrogének jele összeolvad.)



10.25. ábra. Vázlatos ábra két cserélődő mag rezonanciajelének hőmérsékletfüggésére

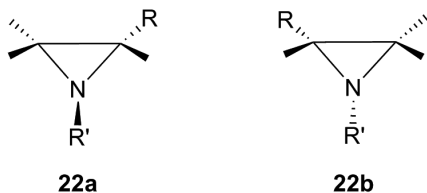
A cserefolyamatok nemcsak a jelalakot, de a multiplicitást is megváltoztathatják. Például az absz. etanol elkülönülő OH-jele 1:2:1 triplett (a  $CH_2$  csoporttal való csatolás miatt), a metilénjel pedig kettős kvartett (8 vonalból áll), míg a normál alkoholban utóbbi jel 1:3:3:1 kvartett, az OH-hidrogén pedig, a víztartalom jelével átfedve, intenzív szingulettként jelentkezik. A cserefolyamatok közben ui. a spinállapotok is gyorsan változnak az NMR-időskálához mérten (rövidül átlagélettartamuk) és ezért a kölcsönható magok nem képesek „észlelni” a partner kvantumállapotát.



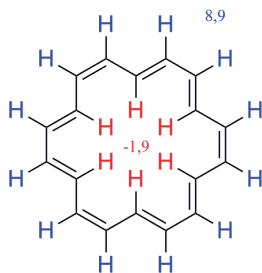
A cserefolyamatok felhasználhatók a jelhozzárendeléshez, nevezetesen a savanyú hidrogének jelének azonosításához. Ha a vizsgált oldathoz savat vagy lúgot adunk, felgyorsulnak a cserefolyamatok, s változik a mozgékony hidrogénjelek alakja és/vagy helye, míg D<sub>2</sub>O-dal összerázva az oldatot a H → D csere következtében eltűnnek ezek a jelek („kirázásos módszer”).

A gátolt rotáció és a mozgékony hidrogének cserefolyamatai mellett több más, hasonló molekuladinamikai jelenség is hasonló módon hat az NMR-spektrumra. A ciklohexán *axiális* és *ekvatoriális* hidrogénjei közös jelet adnak szobahőmérsékleten: az <sup>1</sup>H NMR-spektrum egyetlen szingulett a gyors *gyűrűinverzió* eredményeként. Az oldatot kb. -60 °C-ra hűtve a két pozíciónak megfelelően szétválik a H(*ax*)- és H(*eq*)-jel és az előbbi jóval szélesebb (a nagyobb *diaxiális* csatolások következtében). A *konformációs mozgások* számos más fajtája is jól vizsgálható NMR-módszerekkel.

Az *atomi inverzió* sebessége ugyancsak befolyásolja a spektrum-szerkezetet. A nitrogéninverzió alacsony potenciálgátja miatt az NRR'R'' típusú vegyületek racemátok, mivel enantiomerjeik igen gyorsan egymásba alakulnak. Egyes **22a,b** szerkezetű aziridinszármazékok inverziója viszont lassú (az R' szubsztituenstől függően), ezért ezek diasztereomerekként preparatív is szétválaszthatók.



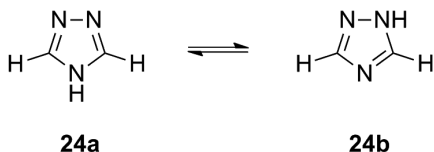
Hasonlóképpen, szervesetlen vegyületek ligandumcsere-folyamatai is tükröződnek az NMR-spektrumokban. Például az XY<sub>5</sub> típusú (SF<sub>5</sub>, Fe(CO)<sub>5</sub> stb.) molekuláknál fellépő ún. *Berry-átrendeződés* miatt a trigonális bipiramis *ekvatoriális* és *axiális* helyzetű ligandumai (a fenti példákban az F- és C-atomok) közös jelet adnak a <sup>19</sup>F, illetve <sup>13</sup>C NMR-spektrumban: az F-, illetve a C-atomok kémiaiilag ekvivalensek.



**23**



A *vegyérték-izoméria* szintén az NMR-spektrum hőmérsékletfüggését okozhatja. Az aromás annulének ( $4n + 2 \pi$ -elektron), így a 18-annulén (**23**) merev molekulák és az aromás köráramok a makrociklus belsejében lévő H-atomok extrém árnyékoltságát ( $\delta = -1,9$  ppm), míg a külsők jelének a benzolszármazékokénál is jóval nagyobb paramágneses (**23** esetén 8,9 ppm-es) eltolódását eredményezik. A flexibilis antiaromás analógoknál a belső és külső hidrogének szobahőmérsékleten gyors helycseréje közös jel fellépését eredményezi. Például a 24-annulén (24  $\pi$ -elektron) szingulett jele 6,84 ppm-nél van.



E jelenségekhez sorolható végezetül a *tautoméria*, amely az NMR-spektrumok oldószerfüggéséhez vezethet. Az 1,2,4-triazol DMSO- $d_6$  oldatban készült  $^1\text{H}$  NMR-spektrumában egyetlen CH-jel van (7,85 ppm-nél), míg OP(NMe $_2$ ) $_3$  oldószerben két jel lép föl (7,92 és 8,85 ppm-nél) a **24a**, illetve **24b** tautomer preferált előfordulását igazolva a tautomer egyensúlyban.

## 10.2. Az NMR-spektroszkópia gyakorlata

### 10.2.1. Minta-előkészítés

Szerves molekulák folyadékfázisú NMR-szerkezetazonosításához általában néhány mg anyagból kb. 0,6 cm $^3$  mintaoldatot készítünk deuterált, leggyakrabban CDCl $_3$  vagy DMSO- $d_6$  oldószerben. Számos további szerves oldószer is használható (per)deuterált formában. Deuterált oldószerekre egyrészt az ún. „lock” biztosításához (10.2.2. pont), másrészt azért van szükség, hogy az intenzív oldószerjel ne fedjen el hasznos spektrumtartományt. (Utóbbi probléma szükség esetén más módon is megoldható (vö. 10.1.1. pont). A protikus oldószerek, a CD $_3$ OD és a D $_2$ O a mérendő anyag mozgékony OH, SH és NH protonjait sav-bázis reakcióban deuteronra cserélik, így ezek jele eltűnik az  $^1\text{H}$  NMR-spektrumból. Főként peptidek és fehérjék vizsgálatakor hátrányos az amidprotonok jeleinek elvesztése, ezért ezeket (megfelelő pH-t biztosító puffer jelenlétében) 90-95 térfogat%-os H $_2$ O-ban oldjuk és mindössze 5-10% D $_2$ O-t alkalmazunk a „lock” biztosításához.

Az oldat célszerűen referensanyagot is tartalmaz a  $\delta = 0$  ppm beállításához, amely  $^1\text{H}$  és  $^{13}\text{C}$  NMR-ben ma már kizárólag a tetrametilszilán ( $\text{SiMe}_4$ , TMS). A szimmetrikus és indifferens molekula jele igen éles, ezért pontosan mérhető és nem lép kölcsönhatásba az oldott anyagokkal. A 12 ekvivalens H igen intenzív jele kis mennyiség alkalmazása esetén is jól észlelhető, az illékony TMS könnyen eltávolítható az oldatból, s nem szennyezi a mintát. Jól oldódik a leggyakoribb oldószerekben és a H-magok igen erősen „árnyékolnak”, ezért a legtöbb, más környezetben lévő hidrogén nagyobb kémiai eltolódású, s a  $\delta_{\text{TMS}} = 0$  feltétellel célszerűen pozitív előjelűnek vehető. Vizes, s más olyan oldatokban, amelyekben a TMS nem oldódik, vízdoldható származéka, a DSS ( $\text{Me}_3\text{SiCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{SO}_3\text{Na}$ ) használható referensként, amely pH-független zéruspontot biztosít a kémiai eltolódáskálán.

Az elkészült oldat tartalmazhat alig látható, lebegő szennyezéseket, feloldatlan szilárd részecskéket, amelyek a mérés során rontják a mágneses tér homogenitását, a spektrumjelek kiszélesedését okozva. A mintaoldatot ezért szűrővel célszerű az NMR-csőbe tölteni, amely egyik oldalán zárt, általában legömbölyített végű üvegcső, kupakkal. A rutin NMR-csővek 5 mm külső átmérőjűek, ezekbe 0,6 ml mintát töltve 4-5 cm oldatmagasságot kapunk. Ennek középső, 1,5-2 cm-es szakasza az ún. aktív térfogat, a mintaoldatnak csak ekkora részét érzékeli a mérőtekerccs az NMR-cső mágnesbe helyezése után. A megfelelő pozícionáláshoz (és a mintacső forgatásához, lásd alább) az NMR csövet műanyag rotorba helyezük (10.26. ábra), és sűrített levegővel (vagy nitrogéngázzal) működő pneumatikus „lift” segítségével juttatjuk be a mágnes közepébe, a mérőtekerccshez.

### 10.2.2. Az NMR-spektrométer felépítése és működése

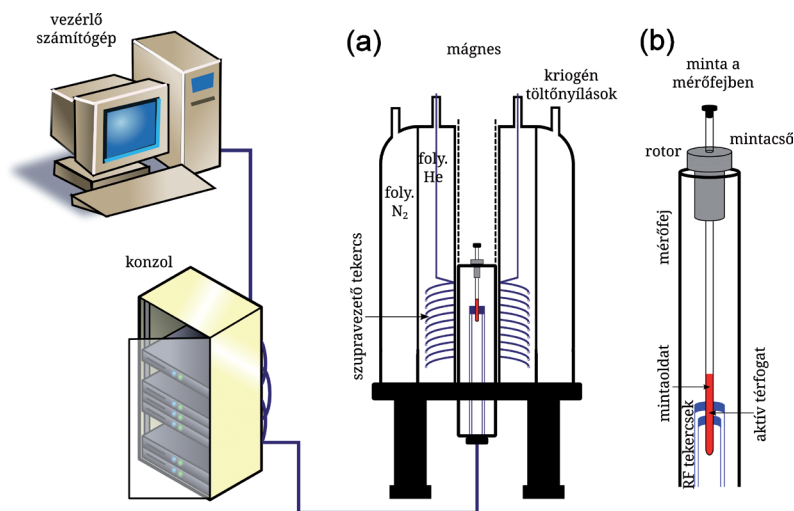
Az FT-NMR-spektrométer több részegység integrált együttese, legfontosabb elemei a mágnes, a mérőfej, a konzol és a vezérlő számítógép.

A *számítógépen* futó mérőprogram irányítja a hardverelemek kommunikációját és műveleteit (pl. a mágneses térhomogenitás létrehozását vagy az RF pulzusok időzítését), valamint ez dolgozza fel a konzolból jövő „nyers adatot”, a FID-et.

A *konzolban* a rádiófrekvenciás adó- és vevőegységek találhatók, melyek együtt „RF csatornákat” alkotnak. Ahány RF csatorna van, egyidejűleg annyiféle NMR-mag ( $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$  stb.) „manipulálható” (lecsatolások, többdimenziós spektrumok). Egy pontos frekvenciaforrás

mindegyik csatorna adóegységében szinuszosan oszcilláló váltófeszültséget állít elő a kívánt rádiófrekvencián, például 500 MHz-en. Ebből egy következő elektronikai egység adott matematikai függvénnyel leírható (pl. időben négyszög profilú) pulzusokat állít elő. Az RF pulzusok különböző csatornákra elosztott, megfelelően időzített sorozatát, a pulzusprogramot erősítés után kábelek továbbítják az NMR-mérőfejbe.

Nagyfelbontású egydimenziós vagy időigényesebb többdimenziós NMR-spektrumok felvételéhez minél erősebb, homogén és stabil mágneses térre van szükség. Két, egymástól 1 Hz-re lévő spektrumvonal felbontásához egy 600 MHz-es készüléken a mágneses tér legfeljebb 1 milliárdnyi egységgel változhat meg térben és időben. Ezeket a szigorú követelményeket, a korábban használt permanens vagy elektromágnesek helyett, ma már szinte kizárólag szupravezető mágnesekkel lehet gazdaságosan megvalósítani.



10.26. ábra. Az NMR-spektrométer sematikus felépítése, a mágnes keresztmetszetével (a) és a kinagyított, a mintát befogadó mérőfejjel (b)

A *mágnes* (sematikusán lásd a 10.26/a. ábrán) szupravezető mérő-tekercse nióbbium-ötvözetet tartalmazó rézszálakból készül (az elérhető térerősség a menetszámtól függ), amely 5 K ( $-268\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) alatti hőmérsékletű folyékony héliumba merül, hogy elektromos ellenállása közel zérusra csökkenjen. A mágnes beüzemeléskor a tetején látható csonkokon betáplált többször 10 amperes áram egészen addig kering külső energia felhasználása nélkül a szupravezető tekercsben, amíg nem engedjük azt fölmelegedni. A folyékony héliumot tartalmazó Dewar-tartályt

hőszigetelő rétegeken keresztül egy még nagyobb, folyékony nitrogénnel (77 K,  $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) töltött kriosztát veszi körül, ennek külső köpenye a kívülről látható, rozsdamentes acélból készült mágnesestest. A tetején lévő csomóponton keresztül rendszeres időközönként folyékony héliumot és nitrogént kell a mágnes megfelelő tartályaiba tölteni az alacsony hőmérséklet fenntartására. Ez teszi költségessé a műszer üzemben tartását (a legkorszerűbb mágneseknél már megvalósították az elpárolgó hélium összegyűjtését és újrafelhasználását). A mágnes légpárnás lábakon áll, mert a környezetből származó mechanikai rezgések „műtermék” jelekhez vezethetnek a spektrumokban. A mágnes opcionális tartozéka a tetejére szerelhető automata mintaváltó, amellyel például hétvégére több minta különböző NMR-mérései előre programozhatók.

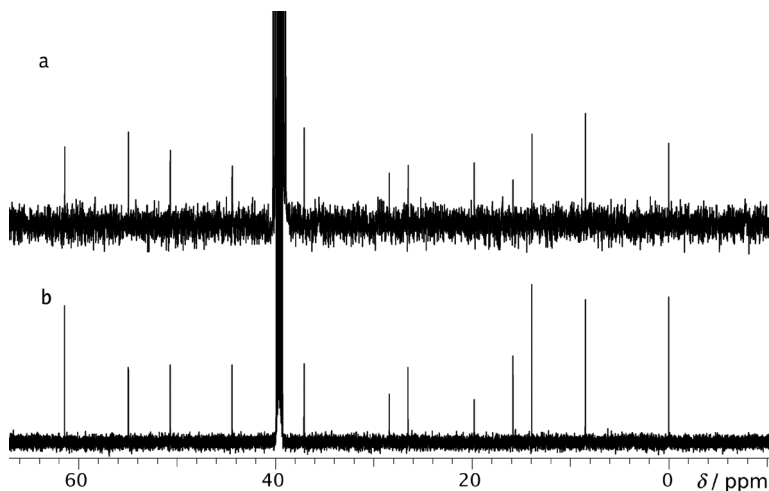
A szupravezető tekercsben keringő áram az erősségének megfelelő, függőleges irányú homogén  $\mathbf{B}_0$  mágneses teret indukál, a mágnes hossz tengelye mentén. A mágnes furatába illeszkedik alulról a mérőfej, felülről pedig a mintacső leengedése történik (10.26/b. ábra).

A mágneses tér lehető legjobb homogenitását korrekciós („shim”) tekercsekkel érik el, amelyek belülről a mágnes furatához csatlakoznak, megfelelő kiképzéssel ahhoz, hogy a számítógép által vezérelt áram betáplálására különböző irányú és alakú mágneses segédtereket („térgradienseket”) hozzanak létre a szupravezető által keltett  $\mathbf{B}_0$  tér inhomogenitásának kompenzálására. A mintacsövet tartalmazó rotor (10-20 Hz frekvenciájú) forgatása sűrített levegővel vagy nitrogénnel az  $x$  és  $y$  irányú térinhomogenitások további kiátlagolására szolgál. A korszerű, 400 MHz-nél nagyobb proton-frekvenciájú műszerek korrekciós rendszere (nagy „shim-készlete”) feleslegessé teszi a forgatást (egy-egy bonyolultabb NMR-kísérletek nem is működnének forgatott mintával).

A mágneses tér nagyságára vonatkozóan fontos tény, hogy a pulzusgerjesztés során detektált rezonanciajel (első közelítésben) annál nagyobb, minél nagyobb az egyensúlyi makroszkopikus mágnesezettség  $M_e$  értéke. A (10.8) összefüggés alapján viszont  $M_e$  annál nagyobb, minél nagyobb az  $\alpha$ -nívó betöltöttsége a  $\beta$ -nívó betöltöttségéhez képest. Az  $\alpha$  és  $\beta$  kvantumállapotok (10.4) szerinti  $\Delta E$  energiakülönbsége rendkívül csekély, így (10.6) alapján az  $N_\alpha$  és  $N_\beta$  közötti különbség is nagyon kicsi, és ez magyarázza, hogy az NMR-spektroszkópia viszonylag érzéketlen módszer. A (10.6) összefüggésből az is látszik, hogy ez a populációkülönbség közel lineárisan nő a  $B_0$  térerővel. Az NMR-spektroszkópia fejlesztésének egyik fő célja a mérési érzékenység növelése. Ennek egyik módja értelemszerűen a  $B_0$  térerő növelése, ami egyúttal a spektrális felbontás növekedésének előnyét is magában hordozza, hiszen (10.5) alapján a térerő növelésével

a rezonanciafrekvenciák egymástól való távolsága is lineárisan nő. E mellett más technikai lehetőségek is léteznek a jel/zaj viszony növelésére. Ezek közül kiemelendő az ún. „hűtött mérőfej” (lásd alább). A 10.27. ábra illusztrálja az érzékenység növekedésének hatását a szükséges mérésidőre, a felbontás növelésének jelentőségét pedig a 10.2. ábra szemlélteti (ld. 10.1.1. pont).

Arról, hogy mérés közben időben milliárdrésznit se „csússzon” a  $B_0$  mágneses tér („drift”), elektronikus szabályozókör, a térfrekvencia-visszacsatolás, az ún. „lock”-rendszer gondoskodik. Ez folyamatosan észleli az oldószer diszperziós  $^2\text{H}$  rezonanciajelét és ha szükséges, automatikusan úgy változtatja a megfelelő shim-tekercs áramát, hogy a mágneses térerősség és a rádiófrekvenciás tér közti Larmor-összefüggés (a rezonancia alapfeltétele) a mérés alatt folyamatosan teljesüljön. A lock biztosításához szükséges erős deutériumjelet leggyakrabban maga az oldószer szolgáltatja.



10.27. ábra. 2,5 mg gyógyszerhatóanyag  $^{13}\text{C}$ -spektruma (a) 100 MHz-en (400 MHz  $^1\text{H}$  frekvencia), normál mérőfejjel, 1024 pulzusból, 40 perc mérésidővel és (b) 200 MHz-en, hűtött mérőfejjel, 256 pulzusból, 10 perc mérésidővel

A mérőfej tartalmazza a mintát körülvevő azon RF tekerceket, amelyek a pulzusokat kiadják, illetve a válaszjelet, vagyis a FID-et detektálják. A mérőfej cserélhető (a mágnesbe alulról helyezik be), különböző alkalmazásokra különböző kiépítettségű fajtái léteznek. Az adott mérőfej felépítésétől függ, hogy milyen átmérőjű NMR-cső befogadására és milyen atommagok ( $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{19}\text{F}$  stb.) mérésére alkalmas (a legáltalánosabban

használt csövek 5 mm átmérőjűek). A mérőfej legfontosabb részei a fémtekercesek és kapacitások, amelyek együttese RF rezgőköröket alkot. A mintacsövet a mérőfejben általában két tekerces veszi körül: a protontekerces vízszintes irányú  $B_1$  gerjesztő pulzusok közvetítésére képes, míg a kisebb frekvenciákra optimált „X-mag tekerces” például  $^{13}\text{C}$ -,  $^{15}\text{N}$ - vagy  $^{31}\text{P}$ -spinekre tudja ugyanezt. A mérés megkezdése előtt azonban a használni kívánt rezgőkört hangolni kell, impedanciáját pedig a mintaoldat dielektromos tulajdonságaihoz (ionerősség, vezetőképesség) kell illeszteni, hogy az RF pulzusok által visszavert teljesítmény minimális, míg a FID „vétele” optimális legyen. A hangolás a mérőfej alján levő hangolórudak kézi állításával történik, az újabb mérőfejekon szoftvervezérelt hangoló motorok szolgálnak erre a célra. Modern mérőfejek a felsoroltakon kívül még ún. térgradiens tekerces(ke)t is tartalmaznak, melyeken áramot átvezetve mesterségesen „elronthatjuk” a mágneses tér homogenitását néhány ezred másodperc időtartamra a  $z$  vagy (ritkábban) az  $x$ ,  $y$  tengely irányában. Ez a lehetőség a spinek további különleges és igen hasznos manipulálására ad módot (lásd alább).

A minta hőmérsékletét a mérőfejbe belépő sűrített levegő vagy  $\text{N}_2$  előfűtésével (ritkábban hűtésével) változtathatjuk (lásd DNMR). VT-mérések során elegendő időt kell hagyni a mintaoldat hőmérsékleti egyensúlyának beállítására.

Speciális mérőfejet használva növelhető az NMR-mérés érzékenysége. Például ha az 5 mm-es helyett 10 mm-es mintacsövet használunk, növeljük az aktív térfogatba jutó spinek számát. Térfogatlimitált minták méréséhez pedig speciális NMR-csövek állnak rendelkezésre: alkalmazhatunk szűkebb átmérőjű betétet (inzert) az 5 mm-es csőben vagy ún. Shigemisciövet, amelynek csak a középső harmadába (200-300  $\mu\text{l}$ ) kerül a mintaoldat. Speciális átfolyó mérőfej szükséges a később tárgyalandó LC-NMR alkalmazásokhoz. A kapilláris mérőfejben a kapillárisra tekercselt rézhuzallal már a 20-50  $\mu\text{l}$  oldatból származó, igen gyenge FID is detektálható. A kapilláris mérőfejek koncentráció-érzékenysége közepes, de a kis térfogat miatt abszolút (tömegre vonatkoztatott) érzékenységük igen nagy (~10 ng). Az érzékenység növelésének hatékonyabb módját képviselik a hűtött elektronikájú mérőfejek, amelyekkel a jel/zaj arány három-négyszeresre növelhető, ami tízszeres mérésidő nyereséget jelent.

A mérőfejből kábelen kilépő FID először az előerősítőre kerül, majd a konzolban egy referenciafeszültséggel keverik, amelynek során hangfrekvenciás (kHz) váltófeszültségű jel keletkezik. Ennek további erősítése után a jelet egy analóg-digitális konverter (komplex)

számsorozattá konvertálja. Az így kapott FID kerül a vezérlő számítógép memóriájába, ahol ezután a Fourier-transzformációval frekvenciafüggő spektrummá alakítható és a regisztráláshoz sokféleképpen feldolgozható.

### **10.3. Az alapspektrumokat kiegészítő legfontosabb NMR-mérési módszerek**

Ebben a fejezetben rövid, felsorolásszerű áttekintést nyújtunk a mai szerkezetfelderítési gyakorlatban leginkább használatos, az egydimenziós „alapspektrumokat” kiegészítő mérési módszerekről, elsősorban a megkapható információk jellegére koncentrálnak. A felsorolt módszerek csak igen kis részét képezik az ismert mérési pulzusprogramoknak,<sup>4</sup> de a bemutatott módszerekből nyerhető információk a legtöbb esetben elegendők a legkülönbözőbb szerves vegyületek szerkezetének egyértelmű meghatározásához.

#### **10.3.1. A <sup>13</sup>C-vonalak csoportosítása a szénatomok rendűsége szerint**

Az APT (attached proton test) az 1D, szélessávú protonlecsatolással készült <sup>13</sup>C NMR-mérésnek olyan változata, melyben a szénrezonanciajelek a hozzájuk kötött hidrogének számától függően adnak pozitív vagy negatív intenzitású jelet: a spektrumban a CH és CH<sub>3</sub> csoportok szénjelei „fölfelé”, míg a CH<sub>2</sub>- és C-szénjelek „lefelé” mutatnak. Amennyiben tehát APT-mérést végzünk, szétválogathatjuk a szénjeleket CH, CH<sub>3</sub>, ill. CH<sub>2</sub>, C típusúakra, azaz egy kérdéses molekula szerkezetének jellegéről többletinformációhoz jutunk. Mivel a később tárgyalandó HSQC-mérésből ez az információ a CH<sub>n</sub> csoportokra lényegesen rövidebb idő alatt, kisebb mintamennyiségből is megkapható, ezért a rutin szerkezetmeghatározás során az APT-t ma már ritkán alkalmazzuk.

E módszer másik, rutinszerűen alkalmazott változata az ún. DEPT (distortionless enhancement of polarisation transfer), amelynek egyik típusában a kvaterner szének vonalai nem jelentkeznek, a CH<sub>3</sub>- és CH-atomoké pozitív, a CH<sub>2</sub>-széneké pedig negatív csúcsként jelenik meg, másik, szerkesztett formájában pedig külön-külön alspektrumként regisztrálhatók a különböző rendű szének vonalai. A DEPT-mérést ugyanazon előnyök (gyorsabb mérés, kisebb mintaigény) jellemzik, mint az HSQC-t.

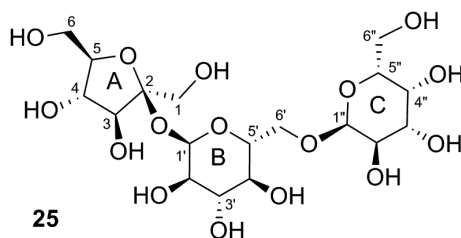


## 10.3.2. Szelektív, egydimenziós NMR-technikák

Az eddig tárgyalt 1D spektrumok felvétele során valamely magfajta (pl.  $^1\text{H}$ ) összes jelének megfigyelése a cél, ezért a  $90^\circ$ -os pulzussal széles frekvenciatartományt gerjesztünk. A formázott RF pulzusok és a pulzált térgradiensek kidolgozása tette napjaink rutinmódszerévé egyes multiplettek, vonalpárok – akár egyetlen vonal – szelektív gerjesztését, elméleti kérdések (egyedi átmenetek hozzárendelése, csatolási állandók előjelének megállapítása), egyenkénti spin-spin, illetve térbeli kapcsolataik felderítése, fedett jelek helyének pontos meghatározása céljából. A szelektív 1D kísérletek előnye, hogy megőrzik a protonspektrum nagy felbontását (igen közeli jelek is jól megkülönböztethetők), míg időigényük a (következő alfejezetben tárgyalandó) megfelelő 2D spektrumokénak csak töredéke, mindössze néhány perc. A szelektív gerjesztésen alapuló módszerek különösen alkalmasak főkomponens melletti kis mennyiségű szennyezők jeleinek kiemelésére, ekkor a nagymennyiségű főkomponens zavaró jeleitől „megtisztítható” a spektrum.

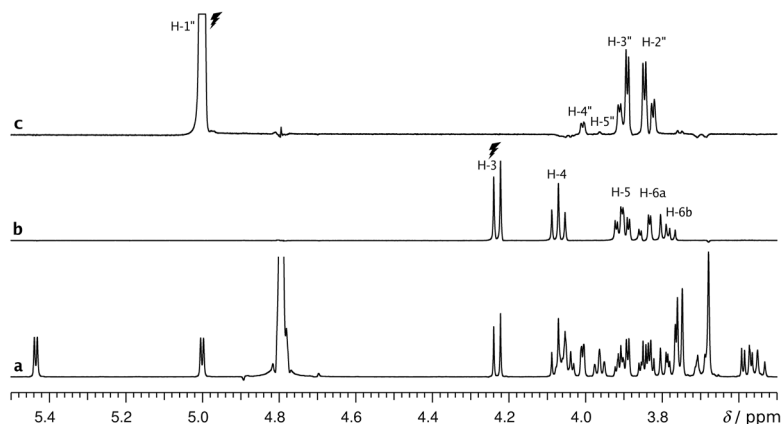
### 10.3.2.1. Szelektív 1D TOCSY-mérés

A TOCSY (total correlation spectroscopy) szekvencia segítségével egy alkalmasan kiválasztott protonjel szelektív besugárzása után a gerjesztés átvihető a vele közös spin-spin csatolási rendszerben lévő más magokra. Az ún. keverési idő (*mixing time*) változtatásával befolyásolhatjuk, hogy elsősorban a közvetlen szomszédok vagy pedig a teljes spinrendszer jelei alkossák a spektrumot. A szekvencia akkor igazán hasznos, amikor a spektrumban van egy vagy több jól elkülönülő jel, amely(ek) szelektíven gerjeszthető(k). A spinrendszer többi, akár más multiplettekkel fedett jele is „kiemelhető” és a jelek multiplicitása megállapítható. Például poliszacharidok (a jól elkülönülő „detektorjel” ezeknél az anomer CH, ha van) egyes gyűrűinek jelei e méréssel elkülöníthetők és egyenként detektálhatók.





A 10.28. ábrán a raffinóz (**25**) protonspektrumában (a) 3,6 és 4,1 ppm között összesen 15 hidrogénmag ad többé-kevésbé átfedő multipletteket. A 10.28/b. ábra 1D TOCSY-spektrumán ezekből „kiválogattuk” a 4,23 ppm-es (H-3) protonnal csatoló partnereket és a multiplettjeik felhasadásából megállapítható, hogy ez a spinrendszer a fruktóz-egységhez (A gyűrű) tartozik. A 10.28/c. ábrán pedig az 5,00 ppm-es anomer protonról induló 1D TOCSY-spektrumon a galaktopiranoz gyűrű (C gyűrű) spinrendszerét azonosíthatjuk. Utóbbi méréshez a 28/b. spektrummal egyező keverési időt alkalmaztunk, de a H-5” metinprotonig alig, a H-6” metilénkéig pedig nem „jutott el” a H-1” protonról indított mágnesszéttség.



10.28. ábra. Raffinóz  $^1\text{H}$  NMR- (a), ill. 1D TOCSY-spektrumai a fruktofuranóz-rész spinrendszeréről, szelektív gerjesztés H-3-on (b) és az  $\alpha$ -galaktopiranoz-gyűrű spinrendszeréről, szelektív gerjesztés H-1"-n (c), keverési idő 60 ms

Ennek oka az, hogy a galaktózban a H-3” és H-4” hidrogének *axiális-ekvatoriális* párt alkotnak, ahol a csatolási állandó lényegesen kisebb, mint *diaxiális* relatív helyzet esetén (vö. 10.1.5.2.2. pont), és ez kedvezőtlen a TOCSY-transzfer számára.

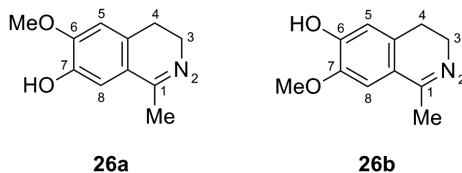
### 10.3.2.2. Szelektív 1D NOESY- és DNOE (DIFFNOE)-mérés

A NOESY- (nuclear Overhauser effect spectroscopy) méréssel térben közel elhelyezkedő protonok között vihető át mágnesszéttség. Az 1D NOESY-mérés során szelektíven invertálva az egyik jelet (kismolekulák esetén) a térközeleli protonoktól származó ellentétes, pozitív jeleket kapunk. Kb. 4 Å távolság az a határ, amelynél kismolekulák esetén még mérhető az effektus. A kapott jel nagyságát befolyásolja a vizsgált molekula mozgási

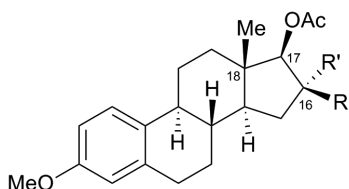
dinamikája, mérete, az oldószer viszkozitása, a mágnes térereje és a keverési idő. Előbbiek függvényében előfordulhat, hogy az effektus térbeli közelség esetén is nulla, ill. negatív! Ezért igen fontos a mérési paraméterek alkalmas megválasztása, a mérés előtt az oldat oxigénmentesítése (az oxigén és esetleges paramágneses szennyezések szélsőségesen felgyorsíthatják a relaxációs folyamatokat, s ezzel „elronthatják” a NOE-t). A NOE eredmények kvantitatív értékelése a fentiek miatt nagy körültekintést kíván.

Az 1D NOESY-technikához hasonló információtartalmú, régebbi módszer a differencia-NOE-mérés. A korszerű NMR-spektrométerek lehetővé teszik, hogy a normál spektrumot kivonjuk a NOE-kat tartalmazóból, amelyet egy vagy több jel telítése közben regisztrálunk. Az ilyen *differencia-NOE-* (*DIFFNOE* vagy *DNOE*) méréseken csak azok a jelek láthatók, amelyeknek az intenzitása a NOE révén megnőtt, vagyis azonosíthatók a besugárzott jelű maghoz térben közeli azonos fajta atomok, illetve az ilyeneket tartalmazó csoportok jelei.

A DIFFNOE technika alkalmazását a **26a** gyógyszer-intermedier szerkezetigazolásával illusztráljuk. A dimetoxiszármazékból parciális hidrolízissel előállított 6-metoxi vegyület mellett a nem kívánatos 7-metoxi termék (**26b**) is keletkezik. A hasznos termék nagyobb arányú keletkezése érdekében végzett kísérletek eredményeinek értékeléséhez fontos volt a két izomer szerkezetének megkülönböztetése. Az egyik termék <sup>1</sup>H NMR-spektrumában (10.29/a. ábra) a 2,34 ppm-es C-metiljelet telítve (10.29/b. ábra) a DNOE-felvételen megjelenik a nagyobb eltolódású aromás hidrogénjel, amely tehát a C-metilcsoporthoz közeli H-8 atomhoz tartozik. A másik, tehát H-5 atomtól származó 6,67 ppm-es jelet besugározva a metoxiszingulett és a 4-es CH<sub>2</sub> csoport jele látható a DNOE-spektrumban (10.29/b. ábra), igazolva, hogy e két csoport szomszédos a metoxiszubsztituenssel, amely tehát 6-os helyzetű, azaz a kívánt **26a** izomertől származik a spektrum.



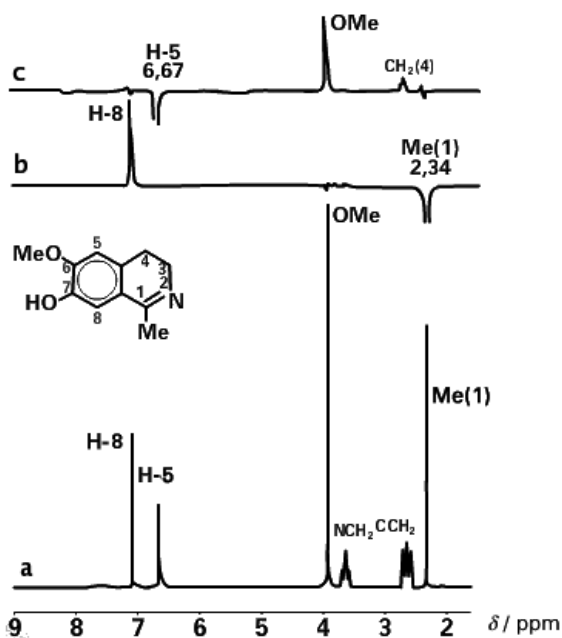
További például szolgálhat a **27a** és **27b** epimer ösztromszármazékok térszerkezetének igazolása. A 16-CH<sub>2</sub>OAc csoport metilénprotonjainak jelét besugározva **27a** vegyület <sup>1</sup>H NMR-spektrumában a 18-metil-szingulett intenzitása jelentősen megnövekszik, jelezve e csoportok



**27a:** R = CH<sub>2</sub>OAc, R' = CH<sub>2</sub>X

**27b:** R = CH<sub>2</sub>X, R' = CH<sub>2</sub>OAc

térbeli közelségét ( $\beta$  helyzetét). A fordított kísérlet (a 18-metil-szingulett telítése a 16-metilén-jelek intenzitásnövekedésével jár) is összhangban van e szerkezettel. Hasonló kölcsönhatás figyelhető meg a 17 $\alpha$ -H atom és a 16-CH<sub>2</sub>X hidrogének között. A **27b** epimer esetén a 18-CH<sub>3</sub> és a 16-CH<sub>2</sub>X hidrogének, illetve a 17 $\alpha$ -H atom és az OAc csoport melletti metilénprotonok között lép föl NOE, bizonyítva a két OAc csoport *transz* állását.<sup>22</sup>



10.29. ábra. A 26a vegyület 500 MHz-es <sup>1</sup>H NMR-spektruma (a), valamint a C-metil (b) és a 6,67 ppm-es aromás proton (c) jelének telítésével nyert DNOE-spektrum

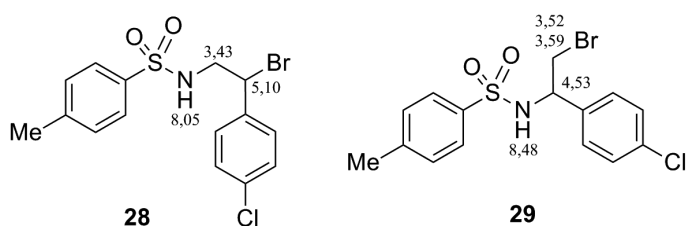
### 10.3.3. Kétdimenziós (2D) NMR-mérések

Az egydimenziós spektrumokkal (kémiai eltolódás–intenzitás függvényekkel) szemben a többdimenziós spektrumok jeleinek intenzitása

több különböző kémiai eltolódás (frekvencia) függvénye:  $f(\delta_1, \delta_2, \dots, \delta_n)$ . Ez utóbbiak közül legegyszerűbbek a 2D spektrumok, melyek a 3-dimenziós térben elhelyezkedő „hegycsúcsokként” képzelhetők el, ahol a jelintenzitás („hegymagasság”) két különböző kémiai eltolódás függvénye. A többdimenziós spektrumokat legcélszerűbb metszetekként ábrázolni (hasonlóan a valódi domborzati térképekhez). Ekként a 2D spektrumot két, egymásra merőleges  $\delta$ -skála alkotja, és a korrelációkat a megfelelő koordinátájú pontokban elhelyezkedő különböző méretű foltok mutatják. A kismolekulák szerkezetmeghatározása során – speciális esetektől eltekintve – elegendő 2D spektrumok felvétele, de fehérjék szerkezetének meghatározásakor 3D, 4D, 5D spektrumok mérése is indokolt lehet. A detektálás érzékenységi okokból – kivételes esetektől eltekintve, amikor azonban többször 10 mg mintamennyiségre van szükség – protonon történik, azaz a skálák egyike az  $^1\text{H}$  kémiai eltolódásoknak felel meg, ez az ún. direkt dimenzió. Az indirekt dimenzió(k) lehet(nek) szintén  $^1\text{H}$ , vagy valamilyen más maghoz (pl.  $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$ ,  $^{19}\text{F}$  stb.) tartozó skálák is. A korrelációk spin-spin csatolásokon, NOE-típusú kölcsönhatásokon, vagy ezek sokféle kombinációján alapulhatnak.

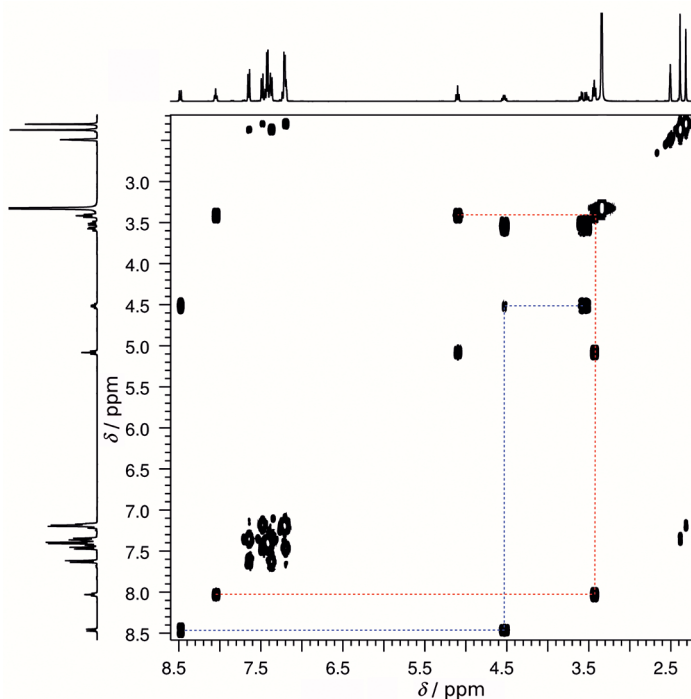
### 10.3.3.1. 2D COSY-spektrum

A 2D COSY- (correlation spectroscopy) spektrum főátlójában az 1D spektrum csúcsait találjuk, közöttük keresztcsúcsot (korrelációt) akkor kapunk, ha spin-spin csatolásban van a két egymáshoz közeli, tehát 2-3 kovalens kötéssel elválasztott mag (leggyakrabban proton).



A például választott minta két izomer vegyületet (**28**, **29**) tartalmaz, kb. 5:4 molarányban. DMSO- $d_6$  oldószerben általában a szulfonamidprotonok jelének is finomszerkezete van, így a főkomponens 8,05 ppm-es triplett amidjele NH-CH<sub>2</sub> szerkezeti részletet valószínűsít. A szomszédos CH<sub>2</sub> jelét a COSY-spektrum (10.30. ábra) 8,05 ppm-es sorában (az ábrán a piros szaggatott vonal mentén) megjelenő 3,43 ppm-es korreláció azonosítja. Ennek a metilénnek a 3,43 ppm-es sorában az 5,10 ppm-es

keresztcsúcs újabb szomszédot jelöl ki, amely az integrálja alapján CH csoport. Az így azonosított NH-CH<sub>2</sub>-CH részlethez a molekula további részének szerkezetét a 2D spektrumokból, illetve a tömegspektrumból adódó elemi összetételből lehet kideríteni. Hasonló módon (az ábrán a szaggatott kék vonalat követve) azonosítható a mellékkomponens NH-CH-CH<sub>2</sub> molekularészlete a 8,48 ppm-es amiddublettől kiindulva. Az utóbbi metilénprotonok a kiralitáscentrum jelenléte miatt diasztereotópok, jelük 3,52 és 3,59 ppm-nél elkülönülve található. A 10.30. ábra bal felső részén látható keresztcsúcsok a metilcsoport távolható [<sup>4</sup>J(H,H), <sup>5</sup>J(H,H) < 1 Hz] csatolásaitól erednek, amelyek az 1D spektrumban felhasadást nem, csak vonalszélesedést okoznak.

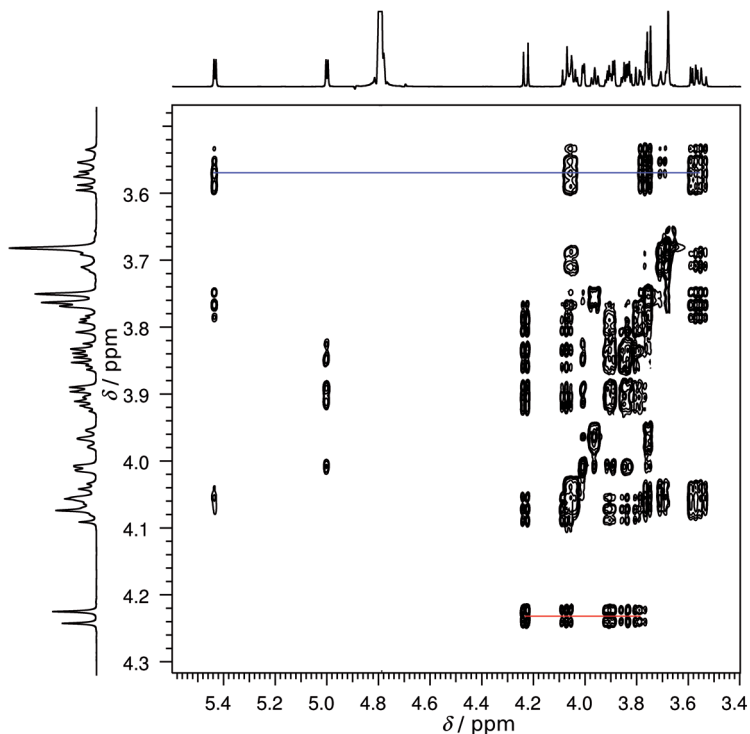


10.30. ábra. Konstitúciós izomerek szerkezetigazolása 400 MHz-es COSY-spektrum alapján (felül az egydimenziós protonspektrum részlete)

### 10.3.3.2. 2D TOCSY-spektrum

A TOCSY-mérés 2D változatával az egyes hidrogénekkal közös spinrendszerben lévő magokról egyszerre nyerhetünk információt. A raffinóz (**25**, vö. 10.3.2.1. pont) 2D TOCSY-spektrumában (10.31. ábra)

az egyes szénhidrát egységek spinrendszerei több vízszintes sorban is ugyanazt a keresztcsúcs-sorozatokat adják. Így például a 4,23 ppm-es kémiai eltolódásnál található sorból (piros jelölés) megállapíthatjuk, hogy a 4,23; 4,07; 3,90; 3,84 és 3,78 ppm-nél megjelenő jelek egy spinrendszerhez tartoznak, melyek rendre a furanózgyűrű 3, 4, 5 és 6 számú hidrogénjeinek a jelei. Hasonlóan, egy spinrendszerbe tartoznak az 5,43, 4,06, 3,77, 3,70, 3,58 és 3,50 ppm kémiai eltolódású jelek (ld. kék jelölés a 3,57 ppm-es sorban), melyek a glükózgyűrű H-1, H-5 és H-6a, H-3, H-6b, H-2 és H-4 atomjaihoz tartoznak.

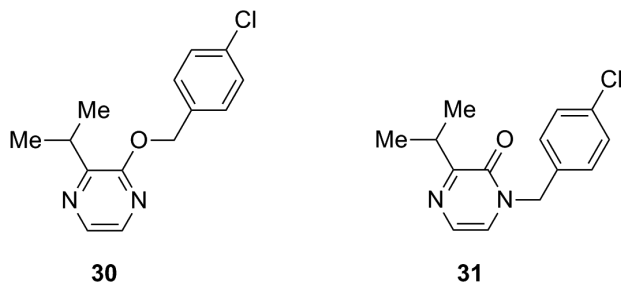


10.31. ábra. A raffinóz (25) 500 MHz-es 2D TOCSY-spektrum részlete nehézvízben

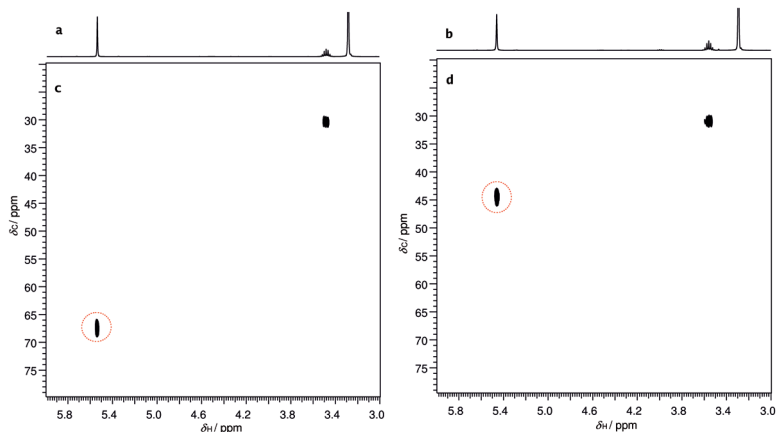
### 10.3.3.3. 2D HSQC-spektrum

A HSQC- (heteronuclear single quantum coherence) spektrumokon az indirekt dimenzió a  $^{13}\text{C}$ -eltolódáskála, amelyről az egyes protonokhoz közvetlenül kapcsolódó szénatomok kémiai eltolódása olvasható le. (Szerkesztett, fázisérzékeny változata, helyes  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  csatolási állandó beállítása esetén, ellentétes fázisú jelet szolgáltat a  $\text{CH}$ -,  $\text{CH}_3$ -, illetve

CH<sub>2</sub>-jelekre: kiváltja a APT-, illetve DEPT-méréseket). A HSQC-spektrum felvételének nagy előnye, hogy amennyiben a kvaterner szén kémiai eltolódásaira nincs szükségünk, akkor a szénspektrum felvétele nélkül is megkapjuk a <sup>13</sup>C kémiai eltolódásokat, egy normál méréshez szükséges idő töredéke alatt.



A 10.32. ábra egy pirazinszármazék alkilezésekor kapott termékek (**30** és **31**) spektrumait mutatja. Az 5,4-5,6 ppm közti szingulettekből nem egyértelmű, hogy *N*- vagy *O*-alkilezés történt-e. A HSQC-spektrumból viszont teljesen egyértelmű, hogy a 32/a. spektrum az *O*-, míg a 32/b. *N*-alkil szerkezetnek felel meg ( $\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{O} \sim 67$  ppm,  $\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{N} \sim 45$  ppm).

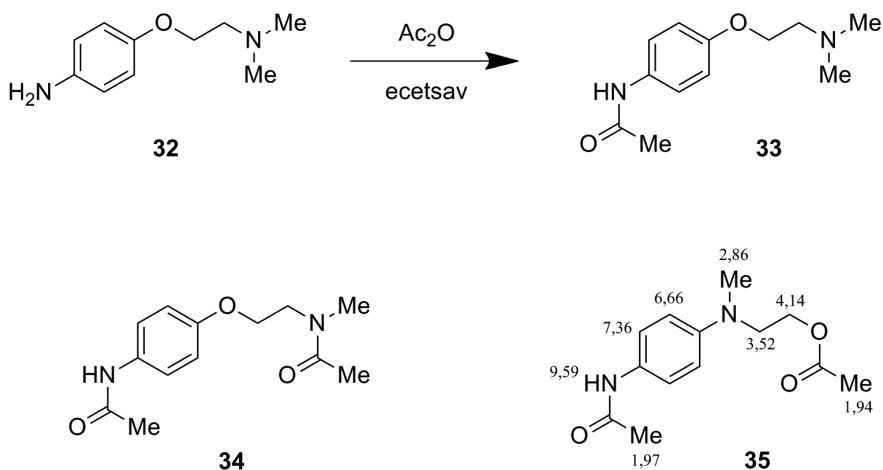


10.32. ábra. A **30** (a) és **31** (b) izomer reakciótermékek 400 MHz-es <sup>1</sup>H NMR-spektrumai és a HSQC-spektrumok, (c) és (d)

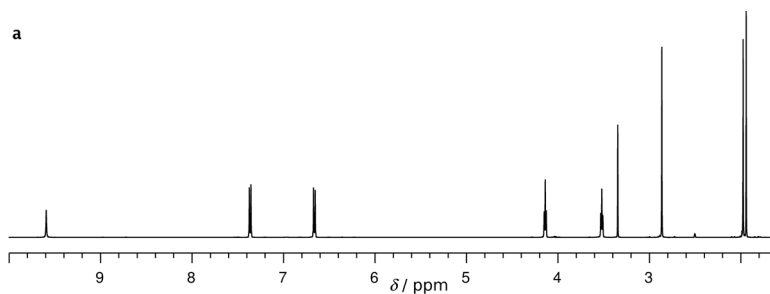
### 10.3.3.4. 2D HMBC-spektrum

A HMBC- (heteronuclear multiple bond coherence) mérés több (2-4) kötésen keresztül szén-proton korrelációk detektálására – a „molekulatopológia”, ti. az atomok kapcsolódási sorrendjének

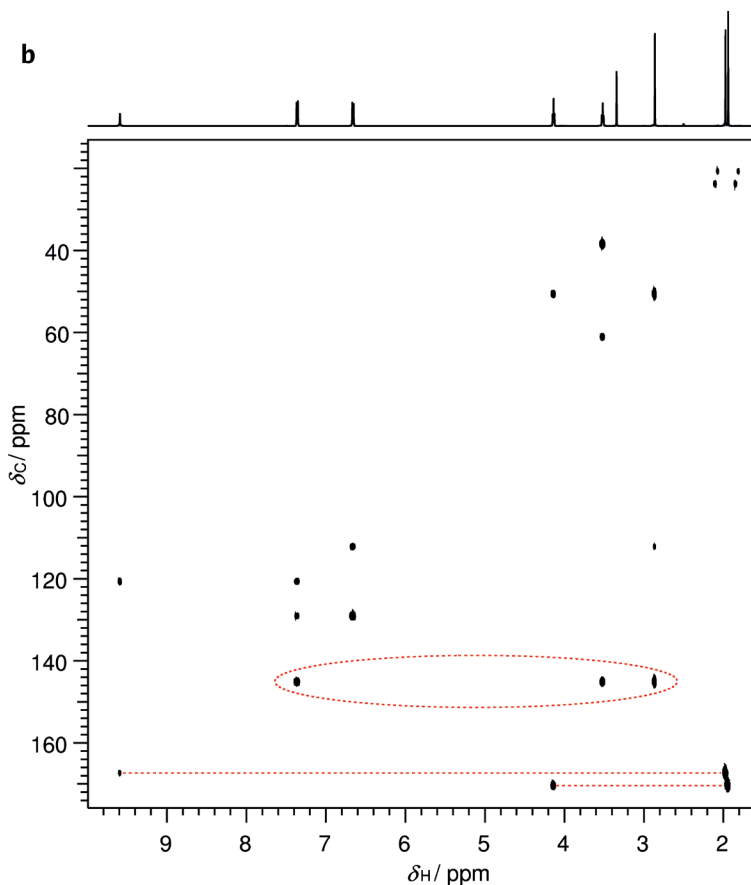
meghatározására – alkalmas módszer. Az  ${}^n\text{J}(\text{C},\text{H})$  csatolási állandók értékétől függően kapunk intenzív, vagy kevésbé intenzív keresztcsúcsokat. Az általánosan használt 8 Hz-re optimalizált méréssel elsősorban három kötésen keresztüli korrelációkat detektálhatunk. Mivel azonban a molekulákban fellépő csatolási állandók molekula-családonként igen különbözőek lehetnek, a spektrumban megjelenő korrelációk nem szolgáltatnak mindig egyértelműen értelmezhető információt az atom-atom konnektivitásokra vonatkozóan. A spektrum értékelése az adott szerkezeti elemre jellemző csatolások tulajdonságainak nagy gyakorlatra épülő alapos ismeretét igényli.



Az itt bemutatott esetben a **32** vegyület acetilezése nyilvánvalóan nem a várt **33** terméket szolgáltatta, mivel az  ${}^1\text{H NMR}$ -spektrumban (10.33/a. ábra) két különböző acetilcsoport metiljele lép föl, de csak egyetlen *N*-metilcsoporté. A kiinduló vegyület és a kémiai reakció alapján kézenfekvő lenne, hogy a várt termék *N*-alkil-*N*-metil-acetamid analógjának (**34**) keletkezését feltételezzük.





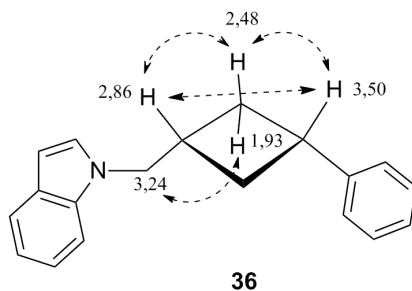


10.33. ábra. A (32)-(33) reakció termékének 500 MHz-es  $^1\text{H}$  NMR- (a) és HMBC-spektruma (b)

A HMBC-spektrum (10.33/b. ábra) bekarikázott sorából azonban megállapítható, hogy mind az egyik  $\text{CH}_2$ , mind az *N*-metilcsoport három kötésre van az aromás gyűrű egyik szubsztituált szénatomjától. Az is látszik, hogy az egyik acetyl csoport valóban NH csoporthoz kapcsolódik, míg a másik karbonilcsoport három kötésre van a 62 ppm kémiai eltolódású metilencsoporttól (ld. vonalak). Eszerint a helyes szerkezet **35**, mely savamid- és észterfunkciót egyaránt tartalmaz.

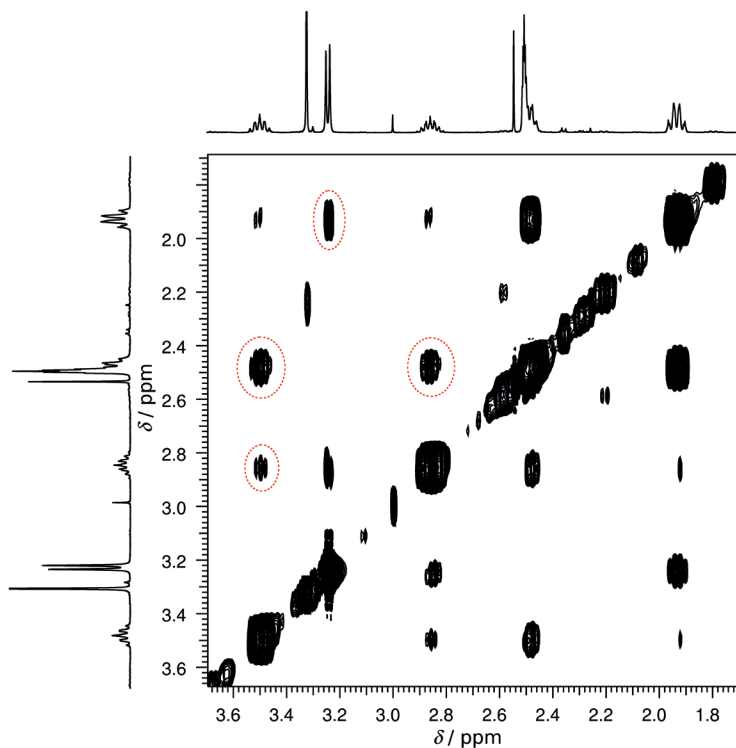
### 10.3.3.5. 2D NOESY-spektrum

A 2D NOESY-spektrum egydimenziós analógjához hasonló, de az összes NOE-t tartalmazza keresztcsúcsokként: az összes protonról egyidejűleg kapunk térközelség információt.



A **36** ciklobutánszármazékról el kellett dönteni, hogy a szubsztituensek *cis*- vagy *transz*-állásúak. A képletben nyilakkal (a spektrumban piros karikákkal) jelölt NOE-korrelációk a *cis* konfigurációt bizonyítják (10.34. ábra).

A pulzusszekvenciák, mint érintettük, szinte korlátlanul, sokféle módon kombinálhatók. Példaként a fenti „alpmérések” kombinálásából származtatható egyetlen ilyen lehetőséget kiemelve egy HSQC-TOCSY mérés-kombinációt említünk. A mérés eredményeképp egy adott  $\text{CH}_n$



10.34. ábra. A **36** ciklobutánszármazék 500 MHz-es 2D NOESY-spektruma

proton TOCSY-szerinti (közös spinrendszerbe tartozó) szomszédjait a  $^{13}\text{C}$ -tengely mentén, kémiai eltolódás szerint külön sorokba bontva (szerkesztve: „editálva”) kapjuk. Így egymással átfedő  $^1\text{H}$ -multiplettek közvetlen környezetét is felderíthetjük, ami pl. szteroidok vázprotonjai, vagy más bonyolult szerkezetek átfedő jeleket adó magjai esetén igen hasznos.

### 10.3.4. Az NMR-szerkezetfelderítés stratégiái

A gyógyszerkémiail szempontrból érdekes molekulák gyakran tartalmaznak a H- és C-atomok mellett heteroatomokat is. Könnyen mérhető kiegészítő információt szolgáltathat a (tipikusan egydimenziós)  $^{19}\text{F}$ - vagy a (kevésbé érzékeny) 1D  $^{31}\text{P}$ -mérés, melyekben a protonokkal létrejövő  $^nJ(\text{X},\text{H})$  csatolás szomszédsági (konnektivitási) információt hordozhat, de szükség esetén szélessávú protonlecsatolással (jelölése pl.  $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ ) akár meg is szüntethető. A molekulák nagy részében előforduló nitrogén feles spinű izotópja, a  $^{15}\text{N}$ , kis előfordulási gyakorisága miatt (ld. 10.1. táblázat) 1D spektrumokban közvetlenül nem mérhető, de HSQC- vagy HMBC-méréssel megkaphatjuk a hidrogének közelében lévő nitrogénmagok kémiai eltolódását és az  $^1J(\text{N},\text{H})$  csatolási állandó nagyságát is.

A fentiekben felsorolt kísérletekből körvonalazódnak az NMR-spektroszkópia határai a szerkezetmeghatározás terén: hidrogénszegény molekularészletek (pl. bonyolult heterociklusok váza; mágnesesen inaktív magokat tartalmazó csoportok) esetén a szerkezetmeghatározása akár megoldhatatlan is lehet, például a **3** vegyület N-, S- és Cl-atomokat magába foglaló részének szerkezetéről legfeljebb a közeli  $^{13}\text{C}$ -magok kémiai eltolódásából következtethetünk. Ilyen esetekben a tömegspektrometria vagy az infravörös spektroszkópia jelenthet fontos segítséget, izomer szerkezetek viszont gyakran csak röntgenkristallográfiával azonosíthatók.

Az NMR-szerkezetbizonyítás menete igen sokféle lehet és döntően a rendelkezésre álló információk, a hozzáférhető mérés technikák, valamint a kutató tapasztalatának függvénye. Amennyiben a várt szerkezetről eredetileg semmit sem tudunk, az elemi összetétel ismerete lehet a kiindulópont. Első lépésként pl. az  $^1\text{H}$  NMR- és HSQC-spektrumok összevetésével listát készíthetünk a szénatomokról, megállapíthatjuk a hozzájuk kapcsolódó hidrogének számát, multiplicitását, a csoport típusát. Az elemi összetétel, ill. a  $^{13}\text{C}$ -spektrum alapján a kvaterner szeneket és a heteroatomokhoz kapcsolódó hidrogéneket is azonosíthatjuk. Következő lépésként a COSY/TOCSY-spektrumokat felhasználva tisztázhatjuk az

előzőekben azonosított csoportok között szomszédsági viszonyokat. A molekularészletek, ill. a hiányzó atomok összekapcsolódásának módját, a molekulaváz szerkezetét HMBC-spektrumok segítségével állapíthatjuk meg. A fenti információk együttes figyelembevételével a szerkezet gyakran egyértelműen bizonyítható, sokszor azonban több alternatív szerkezet sem zárható ki. Ilyenkor további mérések, valamint a kémiai eltolódások különböző számítógépes programokkal lehetséges becslése, és ezek összehasonlítása a mértékkel is segíthetnek a szerkezetigazolásban.

A konstitúció felderítését követően, a szerkezetbizonyítást a molekula sztereokémiájának felderítésével tehetjük teljessé. Meghatározhatjuk a molekulában lévő kiralitáscentrumok relatív konfigurációját (az abszolút konfiguráció megállapítása, bár kivételes esetekben, származékképzést követően, lehetséges, alapvetően nem az NMR-spektroszkópia feladata). Ez legtöbbször 1D NOE/DIFFNOE-, vagy 2D NOESY-spektrumok elemzését igényli és egyszerűbb, ha a kiralitáscentrumokat merev szerkezetű részlet köti össze. Flexibilis szerkezetek esetén a konformációs viszonyokat is tisztáznunk kell. Az NMR-mérési eredményekből – a NOE-korrelációkból – következtethető 3D szerkezet helytállóságát molekulamodellezéssel nyert eredményekkel összevetve ellenőrizhetjük.

## 10.4. Az NMR-spektroszkópia egyéb alkalmazásai a gyógyszerkutatásban

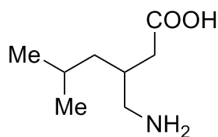
Bár az NMR-spektroszkópia leggyakoribb felhasználási területe kétségtelenül a szerkezetmeghatározás, számos egyéb területen is hasznos lehet. Ezek közül a gyógyszerkutatásban legfontosabbak közül tekintünk át néhányat.

### 10.4.1. Elegyanalízis kvantitatív NMR-rel (qNMR)

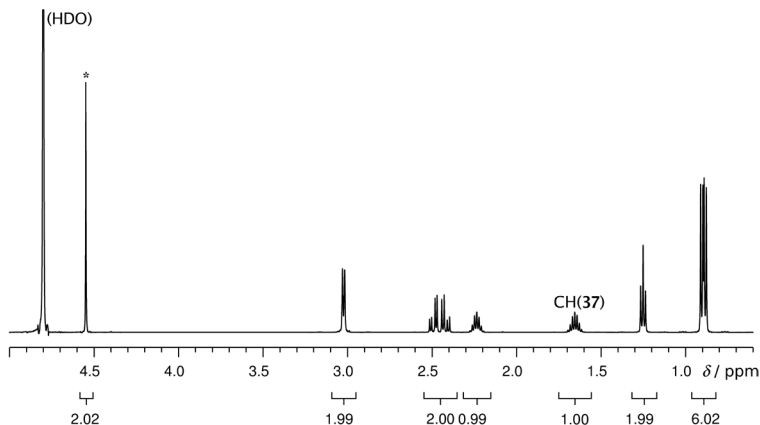
Szerves vegyületek keverékeiben nemcsak az alkotók anyagi minősége (konstitúciója), hanem mólarányuk is vizsgálható NMR-spektroszkópiával. A már tárgyalt okok miatt elsősorban az  $^1\text{H}$  NMR-spektrum jeleinek integráljai alkalmasak erre a célra. A spektrumok kvantitatív értékelésének feltételei, hogy egyrészt mindegyik vegyületnek legalább egy jele ne fedjen át egy másik vegyületével (szelektív integrálhatóság), másrészt megfelelően hosszú relaxációs szünettel biztosítsuk, hogy az integráláshoz választott magok makroszkopikus mágnesezettségét az egyensúlyi  $M_e$

helyzetben (ld. 1.1. pont) érje mindegyik 90°-os gerjesztőpulzus (a szükséges relaxációs várakozás hosszát csökkenthetjük kisebb szögű gerjesztés alkalmazásával, ill. „egy-scans” detektálással).

Példaként szolgálhat a **37** pregabalint és borkósavat tartalmazó hatóanyag egy gyártási tételében a két komponens arányának meghatározása, a D<sub>2</sub>O oldószerben felvett spektrum (10.35. ábra) alapján. A „mozgékony” protonok (OH, NH<sub>3</sub>, COOH) ilyenkor az oldószer deuterionjaival cserélődve egyedi jeleket nem adnak, hanem az oldószerrel közös HDO jelbe olvadnak (vö. 10.2.1. pont). Mindkét molekulában vannak viszont pl. olyan metin-protonok, amelyek jele (itt a borkósav 4,55 ppm-es és a pregabalin 1,65 ppm-es CH-jele) átfedés nélkül integrálható. A pregabalin CH-integrálját önkényesen 1-nek választva a borkósav CH-integrál 2,02-nek adódik, és figyelembe véve, hogy utóbbi jelet a két kémiaiag ekvivalens CH adja, a borkósav/pregabalin molarány 1,01-nek adódik. A minimális eltérés a specifikált 1,00 értéktől az NMR integrálás hibájából adódik.



**37**



10.35. ábra. Borkósav (jele\*) és pregabalín (37) molarányának vizsgálata hatóanyag sarzsban kvantitatív NMR-rel (500 MHz)

Hasonló módon lehet <sup>1</sup>H NMR-rel meghatározni, többek között, például reakcióelegyekben a termékek molarányát, intermedierekben vagy hatóanyagokban szerves oldószer- vagy reagensmaradékok mennyiségét, vagy kész termékekben a hatóanyag és hordozóanyagok (pl.

ciklodextrinek) mólarányát.<sup>2a,23</sup> A kvantitatív NMR speciális esetét képezik az enantiomertisztaság-meghatározások, ekkor (mivel az enantiomerek egyébként azonos spektrumot adnának) általában királis segédanyagot kell alkalmazni (ilyen pl. az ún. „shift-reagens-technika”),<sup>2a,24</sup> vagy származékképzéssel kell diasztereomer párt képezni a vizsgálandó vegyület antipódjaiból. Az összetétel-változás időbeli követésével pedig kinetikai mérések is végezhetők NMR-rel.

### 10.4.2. Ligandum-receptor kötődés vizsgálatok NMR-spektroszkópiával

A kismolekulák fehérjekötődésének tanulmányozása biokémiai, racionális hatóanyag-fejlesztési, valamint farmakokinetikai szempontból egyaránt fontos. E kölcsönhatásokat mind a ligandum, mind a makromolekula oldaláról vizsgálhatjuk NMR-spektroszkópiával.<sup>25</sup>

A fehérjén detektált módszerek közül a 2D <sup>1</sup>H-<sup>15</sup>N HSQC-spektrum alkalmazása a leggyakoribb. Az amidprotonok korrelációs csúcsai a fehérjegerinc állapotát tükrözik és kismolekula hozzáadására bekövetkező változásaikból nemcsak a kölcsönhatás tényére, hanem annak erősségére és a fehérje kötőhelyére is következtetni lehet. Hátránya, hogy <sup>15</sup>N-izotópjelölt fehérje nagyobb mennyiségére (>100 μM) van szükség és kb. 30 kDa-nál nagyobb fehérjék esetén (jelszélesedés miatt) a ma elérhető legnagyobb térerőn is csak nehezen vagy egyáltalán nem alkalmazható.

A ligandum megfigyelésén alapuló módszerek fehérjeigénye 2-3 nagyságrenddel kisebb, és nincs szükség annak izotópjelzésére sem. Kötött állapotban a kismolekula a fehérjével alkotott komplexére jellemző relaxációs, diffúziós és NOE-tulajdonságokat vesz fel, jelei erősen kiszélesednek az oldatbeli szabad állapothoz képest. Ha két populáció között gyors a csere, átlagolt kémiai eltolódások, relaxációsebességek (jelszélességek) vagy diffúziós állandók mérhetők. A gyors csere feltétele miatt a legtöbb ligandumalapú módszer csak a gyenge-közepes affinitású ( $K_d \sim 100 \text{ nM} - 10 \text{ mM}$ ) rendszerekre működik, ezeknek az ún. fragmensalapú gyógyszerfejlesztésben van jelentősége. Kötődő kismolekulák azonosítására (szűrésére, NMR screening) elegyeikből érzékeny módszerek alapulnak <sup>19</sup>F-detektáláson. A ligandum <sup>1</sup>H NMR-jeleit detektáljuk a relaxációs módszerek, vagy az ún. telítés-átvitel-differencia (STD) esetén. Az STD-mérés<sup>26</sup> során a fehérje egyes protonjait besugározva a telítési információ spindiffúzióval szétterjed a makromolekula egészére és a kötődő ligandum fehérjeközelési protonjaira is.

Utóbbiak a kismolekula disszociációja után is megőrzik egy bizonyos ideig ezt a telítési információt, ami a kötődő molekularészlet rezonanciajeleinek intenzitásváltozásában jelentkezik. Vegyülettárak NMR-alapú szűrése oldható fehérjével ma már a gyógyszeriparban is egyre gyakrabban alkalmazott módszer, bár áteresztőképessége nem közelíti meg a biokémiai HTS- (high throughput screening) tesztekét, kivéve talán a szilárd hordozóhoz immobilizált fehérjét, automata átfolyó rendszert, speciális mérőcellapárt és ezen térfogatszelektív  $^1\text{H}$  NMR-spektrumot regisztráló TINS- (target immobilized NMR screening) módszert.<sup>27</sup>

A membránfehérjékhez kötődés vizsgálata lényegesen bonyolultabb feladat, itt elsősorban ligandumoldali (STD, relaxációs) módszerek jöhetnek szóba. Kulcskérdés a fehérje stabilitásának, funkcionális formájának megőrzése a szolubilizálás (esetleg immobilizálás) során, jelenleg ez csak empirikusan megoldható probléma. Mivel a ligandum aspecifikus kötődése, „kitapadása” sokkal valószínűbb egy lipideket is tartalmazó rendszerben, mint oldható fehérjék esetén, kontroll membrán-preparátumok és referencialigandum leszorításán alapuló titrálások nélkül könnyű túlinterepreálni egy-egy esetleges pozitív kötődési eredményt.

A kötődés tényének megállapításánál sokkal értékesebb információt szolgáltat az NMR egy-egy kötődés sztereokémiájáról a racionális hatóanyag-fejlesztés számára. Például STD-módszerrel azonosíthatók a ligandum fehérjével legszorosabb kontaktusban lévő protonjai (epitóp feltérképezés). Transzferált NOESY alapján a kötődő ligandum térszerkezetét, interligandum NOE-k (ILOE) alapján pedig egy fehérje szomszédos helyein kötődő ligandumpárt azonosíthatunk. Az NMR-rel kapható ligandumoldali szerkezeti információ különösen értékesnek bizonyulhat membránfehérjére kötődő hatóanyagok fejlesztése során, amikor a röntgenszerkezet nem ismert.

### **10.4.3. Elválasztástechnikával kapcsolt NMR**

Az NMR-spektroszkópia elválasztástechnikai (folyadékromatográfiás vagy kapilláris elektroforézis) módszerek detektoraként is használható. Az LC-NMR gyógyszeripari felhasználásakor (elsősorban metabolitok és nyomszennyezők szerkezetfelderítésében) azt kell eldönteni, hogy a kérdéses mellékkomponenst célszerű-e inkább preparatív HPLC-vel gyűjteni, dúsítani, izolálni és ebben a formában klasszikus „NMR-csöves” szerkezetmeghatározást végezni, vagy ez a munkaigényes lépés kikerülhető a megfelelő LC-NMR-vizsgálatokkal.

Az LC-NMR-technika az utóbbi két évtized technológiai fejlesztései, így a drasztikus NMR-érzékenységnövekedés (hűtött mérőfejek, „micro-(cryo)-probe-ok“ megjelenése), az átfolyó küveták kifejlesztése, valamint a hatékony oldószer elnyomási pulzusprogramok (vö. 10.1.1 pont) kidolgozása után került a kereskedelmi forgalmazás szintjére. A gyógyszeripar szempontjából elsősorban az új természetes vegyületek/növényi extraktumokból való azonosítása, adott gyógyszervegyületek/-jelöltek metabolizmusának a kutatás egyre korábbi fázisaiban való feltérképezése, valamint a hatóanyagok, készítmények fejlesztése során felbukkanó szennyezések, bomlástermékek azonosítása a kiemelt feladatok. Mindamelllett, hogy a közlemények száma ezeken a területeken is folyamatosan növekedett és növekszik,<sup>28</sup> az on-line LC-NMR várt széleskörű elterjedése a gyógyszeripar területén mégsem következett be. Ennek legfőbb oka az, hogy a gyakorlati megvalósítást tekintve az NMR-spektroszkópia off-line használatával összehasonlítva korántsem egyértelműek az on-line LC-NMR nyújtotta előnyök.<sup>28b</sup> Ennek az összehasonlításnak sarkalatos kérdése továbbra is az NMR-érzékenység, hiszen ez még a ma elérhető nagy érzékenységű spektrométerek esetében is limitáló tényező.

Ha egy tipikus metabolitazonosítási feladatot tekintünk, ahol például egy 10–50  $\mu\text{M}$  oldhatóságú, 400 dalton körüli relatív molekulatömegű gyógyszerjelöltből mintegy 10–30%-ban képződik metabolit, utóbbi koncentrációja a rendelkezésre álló biológiai mintában kb. 400 ng–6  $\mu\text{g/ml}$ . Ez a koncentráció a biztos szerkezetazonosításhoz szükségesnek a legalsó határa, és még akkor is csak korlátozott információtartalmú spektrumokat (1D és homonukleáris 2D  $^1\text{H}$ ) remélhetünk reális időbefektetéssel, ha a metabolit tisztán izolálva, deuterált oldószerben lenne ilyen koncentrációban feloldva. Ezzel szemben a metabolitvizsgálatra kapott biológiai minta általában korlátozott térfogatú,  $\text{H}_2\text{O}$ -alapú és nagy pufferkoncentrációjú (sótartalmú), és az utóbbi komponensek további zavaró protonjeleket eredményezhetnek a spektrumba. Az on-line LC-NMR-alkalmazásnak előfeltétele ekkor olyan kromatográfiás módszer kidolgozása, amely a fenti biológiai minta nagy részének egyetlen injektálásával a keresett komponens minél nagyobb mennyiségét az átfolyó cellába tudja juttatni. Ezen túlmenően, költség-hatékonysági szempontokat is tekintve, a kromatográfiás módszert úgy kell optimalnina (tipikusan  $\text{D}_2\text{O}$  és  $\text{CH}_3\text{CN}$  eluensek használata), hogy a mért NMR-spektrumokban a kérdéses komponens jeleiből minél kevesebb essen az oldószer elnyelés (jelelnyomás, ld. 10.1.1. pont) miatt használhatatlanná vált spektrumtartományokba.



Hasonló nehézségekkel jár a szennyezések szerkezetfelderítése, illetve természetes vegyületek azonosítása extraktumokból, amikor az elérhető mintatérfogat és összetétel ugyan általában eltér a fent leírtaktól, ám az NMR-szemponokat ekkor is szem előtt kell tartani a sikeres megoldás érdekében. A kérdéses szerkezetű és igen kis anyagmennyiségben rendelkezésre álló minták esetében legbiztosabban a multinukleáris NMR- és MS-vizsgálatok kombinációja célravezető. E megközelítés a gyakorlatban akkor célszerű, ha mód van off-line NMR-vizsgálatokra, hiszen ekkor lehetőség van az összes szükséges időigényes, speciális NMR-felvételre anélkül, hogy a mintának az LC-küvetében való diffúziója időbeli határt szabna a méréseknek. Mindent egybevetve, ha a lehető leggyorsabban kell pl. egy ismeretlen nyom-szennyező szerkezetét meghatározni, nem egyértelműek az LC-NMR előnyei, és az ideális munkamenet kialakítása a fenti kérdések gondos mérlegelését igényli.

Az LC-NMR hátrányait kiküszöbölendő, az utóbbi évtizedben az on-line LC-NMR alkalmazásokról a fókusz (a fenti területeket figyelembe véve) egyre inkább az „at-line” LC-SPE–NMR felhasználás felé látszik eltolódni. Itt a keresett komponens kromatográfiás elválasztását követően annak frakcióját szilárdfázisú extrakciós tölteten dúsítjuk, majd a megfelelő deuterált oldószerben oldva, NMR csőben vesszük fel a szükséges spektrumokat. Ugyanakkor az extrakciós lépés beiktatásával a keresett komponensből értékes anyagmennyiséget veszíthetünk, ami megnehezítheti a szerkezet felderítését. Emellett, amíg az on-line LC-NMR egyetlen injektálása során a „kromatográfiás szennyezésektől” (oszloptöltetről, eluensből dúsuló komponensektől) származó jelek nem zavarják a keresett komponens jeleinek azonosítását, addig a többszöri injektálás és extrakció miatt az LC-SPE minta-előkészítés során ezek a komponensek akár a keresett ismeretlenek mennyiségével összevethető mértékben dúsulhatnak fel, megnehezítve az utóbbiak NMR-jeleinek azonosítását a keverék spektrumából.

## 10.5. Irodalom

1. Pople, J. A.; Schneider, W. G.; Bernstein, H. J. *High-Resolution Nuclear Magnetic Resonance*, McGraw-Hill: New York, **1959**.
2. (a) Sohár P. *Mágneses magrezonancia-spektroszkópia, I-II*, Akadémiai Kiadó, **1976**. (b) Sanders, J. K. M.; Hunter, B. K. *Modern NMR Spectroscopy. A Guide for Chemists*, Oxford University Press, **1987**. (c) Derome, A. E. *Modern NMR Techniques for Chemistry Research*, Pergamon **1987**. (d) Hore, P. J. *Mágneses Magrezonancia*, Nemzeti Tankönyvkiadó, **1995**. (e) Claridge, T. D. W. *High-Resolution NMR Techniques in Organic Chemistry*, Pergamon, **1999**.

3. Harris, R. K. H.; Becker, E. D.; de Menezes, S. M. C.; Goodfellow, R.; Granger, P. *Pure Appl. Chem.* **2001**, *73*, 1795.
4. Berger, S.; Braun, S. *200 and More NMR Experiments*, Wiley-VCH, **2004**.
5. Arnold, J. T.; Dharmatti, S. S.; Packard, M. E. *J. Chem. Phys.* **1951**, *19*, 507.
6. Sohár P.; Sipos Gy. *Acta Chim. Acad. Sci. Hung.* **1971**, *67*, 365.
7. Sohár P.; Ocskay Gy.; Vargha L. *Acta Chim. Acad. Sci. Hung.* **1975**, *84*, 381.
8. Lempert-Sréter M.; Sohár P. *Acta Chim. Acad. Sci. Hung.* **1967**, *54*, 203.
9. (a) Karplus, M. *J. Chem. Phys.* **1959**, *30*, 11.; (b) *ibid* **1960**, *33*, 1842.; (c) Haasnoot, C. A. G.; de Leeuw, F. A. A. M.; Altona C. *Tetrahedron* **1980**, *36*, 2783.
10. (a) Sohár P.; Gera L.; Bernáth G. *Org. Magn. Resonance* **1980**, *14*, 204.; (b) Sohár P.; Fülöp F.; Bernáth G. *ibid* **1984**, *22*, 527.; (c) Sohár P.; Stájer G.; Szabó A. E.; Fülöp F.; Szunyog J.; Bernáth G. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. II* **1987**, 599.
11. Padvá, A.; Shefter, E.; Alexander, E. *J. Am. Chem. Soc.* **1968**, *90*, 3717.
12. Levy, N. *Carbon-13 Nuclear Magnetic Resonance for Organic Chemists*, John Wiley & Sons, **1972**.
13. Wehrli, F. W.; Wirthlin, T. *Interpretation of Carbon-13 NMR Spectra*, Heyden, **1976**.
14. Sohár P. *Szénrezonancia-spektroszkópia. A kémia újabb eredményei 58*, Akadémiai Kiadó: Budapest, **1984**.
15. Grant, D. M.; Cheney, B. V. *J. Am. Chem. Soc.* **1967**, *89*, 5315.
16. Dalling, D. K.; Grant, D. M. *J. Am. Chem. Soc.* **1967**, *89*, 6612.
17. (a) Anderson, W. A. *Phys. Rev.* **1956**, *102*, 151.; (b) Freeman, R., Murray, G. R., Richards, R. E. *Proc. Roy. Soc. (London)*, **1957**, *A242*, 455.
18. Neuhaus, D.; Williamson, M. *The Nuclear Overhauser Effect in Structural and Conformational Analysis*, VCH Publishers, **1989**.
19. Solomon, I. *Phys. Rev.* **1955**, *99*, 559.
20. Oki, M. *Applications of Dynamic NMR Spectroscopy to Organic Chemistry*, VCH Publishers, **1985**.
21. Looney, C. E.; Phillips, W. D.; Reilly, E. L. *J. Am. Chem. Soc.* **1957**, *79*, 6136.
22. Sohár P.; Fürjes A.; Wölfling J.; Schneider G. *Synthesis* **1992**, *12*, 1280.
23. Holzgrabe, U., Deubner, R., Schollmayer, C.; Waibel, B. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2005**, *38*, 806.
24. Sohár P. „NMR siftreagens-technika” *Kémiai Közlemények*. **1982**, *57*, 315.
25. Lepre, C. A.; Moore, J. M.; Peng, J. W. *Chem. Rev.* **2004**, *104*, 3641.
26. Meyer, B.; Peters, T. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, *42*, 864.
27. Marquardsen, T., Hofmann, M.; Hollander, J. G.; Loch, C. M. P.; Kiihne, S. R.; Engelke, F.; Siegal, G. *J. Magn. Reson.* **2006**, *182*, 55.
28. (a) Albert, K. *On-line LC-NMR and Related Techniques*, John Wiley & Sons, **2002**; (b) Elipe, M. V. S. *Anal. Chim. Acta* **2003**, *497*, 1.

# Tárgymutató

## A

- abszorbancia 245-249, 253, 255, 257, 258, 260-262
- abszorpció 223, 226, 232
- abszorpciós jel 333, 345
- maximum 244, 246, 247, 249, 253, 256, 257
- AFM 123, 127, 138, 140, 143
- -tű kiválasztása 139
- akceptor 196, 202
- akkumuláció, spektrumakkumuláció (CAT) 342, 343
- aktív gyök 137
- térfogat 386, 390
- aktiválási szabadentalpia 382
- alagútáram 131-133, 136
- $\alpha$ - és  $\beta$ -effektus 372, 373
- állapotsűrűség 132
- allilcsatolás 370
- amorf anyagok 81, 96-101
- analizátor 148, 157-160, 163
- anharmonicitás 270
- anharmonicitási konstans 309
- anharmonikus oszcillátor 309, 310
- anizotróp szomszédcsoport-hatás 359, 360, 374
- anomális diszperzió 173
- anti-Stokes-szóródás 263, 264
- anyagazonosítás 314-316
- áramlási ellenállás 6, 27
- árnyékolás (ld. diamágneses eltolódás)
- árnyékolási kúp 359
- aromás köráramok (benzolgyűrű anizotróp hatása) 360, 361, 374, 385
- aszimmetrikus egység 175
- aszinkron spektrum 304, 305
- átfolyó mérőfej/küvetta 390, 408
- átlagélettartam 336, 378, 382
- átlagtömeg 151
- at-line 312, 327
- átmeneti valószínűség 336
- atomabszorpciós koefficiens 224
- atomi inverzió 384
- atomizálás 229-231, 235
- átsöprés (sweep) 357
- automata mintaváltó 388
- auxokróm csoport 243, 244

## B

- batokróm eltolódás 244, 254
- Benomil (Benlate) 112, 113
- Berry-átrendeződés 384
- bevonás 317, 321-323, 327
- bias feszültség 131
- Boltzmann-állandó, -egyensúly, -eloszlás, -törvény 336, 337
- Born–Oppenheimer-közelítés 265, 266
- Bravais-rács 172

## C

CE-MS 164  
centrálrt rác 172  
ciklodextrin 103, 104  
Connes-elóny 280  
contact üzemmód 138  
CRTA 73  
CVU-egység 259

## CS

csatolás 348-350, 360, 364, 365, 368, 370,  
377, 378, 380, 383, 403  
csatolási állandó 349-351, 365, 367, 393,  
398, 403  
csatolt rezgések 269, 272  
— technikák 289  
csavartengely 172  
cserefolyamatok 343, 381-384  
csomagolóanyag 323  
csúcskapacitás 35  
csúszósík 172

## D

Darcy-törvény 6  
Darling–Dennison-rezonancia 310  
deformációs rezgés 319  
delokalizáció 274  
depolarizációs Raman-hányad 286  
design of experiment (DoE) 42, 47  
design space (DS) 42, 49, 58  
detektor 145, 146, 148, 165  
deutériumlámpa 252  
diád 212-214

diamágneses eltolódás (árnyékolás, upfield  
shift) 357, 360, 361, 373  
diasztereotóp magok 356, 357, 397  
dibenzoil-borkósav (DBBS) 94-96  
didímium szűrő 256  
diédeser szög 365-368  
diffrakációs optikai rác 251  
diffúz reflexió 311, 323  
dimer 195, 198, 200-202, 212, 213  
dinamikus gőzszorpció (DVS) 107  
— NMR (DNMR), ld. molekuláris mozgások  
NMR-vizsgálata  
direkt módszer 180  
diszkriminanciaanalízis (DA) 314  
diszperziós IR-készülék 279  
— jel 389  
— Raman-készülék 286, 287  
disszociációs állandó 254  
donor 188, 196  
Doppler-effektus 224, 225  
drift (hőmérséklet-változás okozta  
jeleltolódás) 389  
DryLab 46  
DSC 70, 71, 75, 78  
—, hőáram- 72, 78-81  
—, modulált hőmérsékletű (MTDSC) 81,  
99-101  
—, teljesítménykompenzációs 72, 78, 80, 81  
DTA (-jel) 70, 76-78  
DTG (-görbe) 70, 73, 108, 112, 114

## E

Ebert-féle monokromátor 251, 252  
editált (szerkesztett) spektrum 391, 398, 403  
EFM 141  
egy-, két- és zérókvantumú átmenetek 380

elektródnélküli kisülési lámpa 227  
elektromágneses sugárzás 240, 241  
elektronátmenet 242, 243  
elektronspektroszkópia 242  
elektronszerkezet 122, 137  
elektrotermikus atomizálás 229  
elemi cella 172, 175  
— képmező (képpont, pixel) 326  
elméleti tényérmagasság 4  
— tényérszám 3, 9  
első generációs monolit 24  
első-, magasabb rendű kölcsönhatás,  
  spinrendszer 335, 351, 353-356, 365  
elúciós módszer 4  
elválasztási ellenállás 29, 36  
emlőszejtes fermentáció 323, 324  
enantiotóp magok 356  
érdeesség 143  
erőálló (kötéserősségi állandó) 266  
euklideszi távolság 313-315  
eutektikus rendszer 90-94

## F

fajlagos abszorbanca 246-248, 253-255, 258  
farmakokinetika 147, 167  
fázis, fáziskoherencia 344, 398  
fázisátalakulás, eutektikus rendszeré 91  
— (olvadás, kristályosodás) 82-87, 90, 97  
— (szilárd-szilárd módosulatváltozás) 82-87  
fázisdiagram mérése DSC- vagy DTA-  
  módszerrel 90-93  
—, két- és háromkomponensű rendszereké  
  90-94, 98  
fázisprobléma 173, 174, 180  
fáziszög 180  
fehérjék elválasztása héjszerű tölteten 25  
— — monolit tölteten 30

fejlődőgáz-elemzés (EGA, EGD) 69, 70,  
  102-118  
felbontás 132, 134, 152, 159, 163  
— ( $R_s$ ) 3, 33, 49  
—, spektrális 335, 341, 387, 388  
felharmonikus rezgés (rezgési  
  felharmonikus) 265, 270, 277, 282, 309  
felhasadás (jelmultiplicitás), finomszerkezet  
  348, 349, 377, 396  
Fellgett (multiplex)-előny 280  
felületmódosítás 137  
fénymutató 128  
Fermi-rezonancia 277, 310  
Fermi-szint 131  
flat scanner 127, 128  
FMM 141  
folyamatfelügyelő, -analizáló technológia  
  (PAT) 322, 325  
folyamatos gerjesztés (CW) 343, 344  
fordított fázis 42  
formázott (tailored) pulzus 343  
foton 241  
Fourier-transzformáció (FT) 179, 341, 342,  
  391  
Fourier-transzformációs IR-készülék 280  
— Raman-készülék 287  
főkomponens-analízis (PCA) 313, 314, 317  
főkomponens-regresszió (PCR) 318, 319  
fragmentáció 145, 149, 156, 157  
ftálsav (-anhidrid) 116-118  
FT-NIR-technika 319  
fűthető tárgyasztalú módszerek 102

## G

gátolt rotáció 381, 382, 384  
GC-MS 146, 162, 164, 166  
geminális csatolás 365

gerjesztőfrekvencia 378  
gír 171  
giromágneses együttható/konstans 332, 337  
gradiens elválasztás 35  
— idő 46  
— késleltetési idő/térfogat 12  
— meredekség 46

## GY

gyengített totálreflexió (csillapított teljes reflexió, ATR) 284, 311  
gyors folyadékkromatográfia 3, 7, 61  
gyűrűinverzió 384

## H

harmonikus oszcillátor 307-310  
— — modell 266, 269  
hasonlósági index (CI) 316  
hatóanyag-tartalom 262  
háttérkorrekció 232  
háztető-szerkezet 351  
héjszerű töltet 21  
hideggőz-eljárás 235  
hidrát (kristályhidrát) 74, 75, 94, 95, 107-111, 184, 185  
hidridgenerálás 234  
hidrogénhid 185, 187, 194-196, 199-201, 204, 207  
hidrogénkötés 277, 278  
hiperkróm hatás 244  
hiper-Raman-szóródás 302  
hiperspektrális képpalkotó eljárás 326  
hipokróm hatás 244  
hipszokróm eltolódás 244  
hitelesítő görbe 233  
holmium kalibrálósűrő 256

Hooke-törvény 307  
hőbomlás (termikus bomlás) 74, 95, 96, 104, 111-117  
hőmérséklet-gradiens 16  
hőmérsékletprogram 69, 75, 76, 80, 99, 101  
—, periodikusan változó 99  
HPLC 2, 6, 10  
HPLC-MS 162-166, 169  
HTLC 37  
hullámhossz 174, 175, 239-241, 244, 246, 247, 249, 251-257, 259, 260  
hűtött mérőfej („cryo-probe”) 389, 408

## I

ikerion 200, 201  
induktív hatás 276  
injektálási szekvencia 12  
in-line 307, 311, 312, 321, 323, 327  
integrált spektrum 346  
interactance szonda 321  
interferenciasűrő 311  
intermittent-contact üzemmód 138  
ionizáció, APCI 153, 156, 162-164  
—, APPI 153, 156, 163  
—, elektronütközéses 150, 152, 162  
—, elektroporlasztásos 153, 155  
IR-tartomány, analitikai (középső) 265  
—, közeli 263  
—, távoli 265  
izokronia, anizokronia 355, 356  
izomorf helyettesítés 181  
izomorfia 173, 190, 191  
izostrukturalitás 173, 184, 190-193, 200, 203, 206, 210  
izotópia 191  
izotópeffektus 376

## J

Jacquinet-előny 280  
jel/zaj viszony 341, 342, 377, 379, 389, 390  
jelintenzitás 343, 346, 349, 380, 381, 396  
jelszélesség, jelszélesedés 341, 368, 386, 406

## K

kalibráció standard hibája (SEC) 320  
kálium-dikromát 258  
kapcsolt módszer, pirolízis GC-MS 105  
— —, TG-FTIR 104-109, 113-115, 117, 118  
— —, TG-MS 104-106, 108-111, 113, 114  
— technikák 161, 162  
kapilláris SFC 61  
karakterisztikus kötési- és csoportfrekvenciák 271  
Karplus-egyenlet 365-367  
KBr-pasztillás technika 282, 284  
kémiail ekvivalencia 353, 356  
— eltolódás 345, 346, 357  
kemometria 307, 310, 311, 313, 314, 317, 327, 328  
képalkotás 290-293, 295  
képalkotó eljárások 321, 326, 327  
képelemzés 141  
képmódosítás 141  
keresztcsúcs, korreláció, korrelációs csúcs 396-398, 400, 401, 406  
keresztfűtés 229, 230  
keresztrelaxáció 380  
keresztvalidálás standard hibája (SECV) 320  
készülék okozta zónaszélesedés 9  
két-, három, multidimenziós (2D, 3D, MD) NMR 345, 395-403  
kettősrezonancia (DR), lecsatolás 377, 378  
keverési idő (mixing time) 392

kinetikus elmélet 7  
— görbék 32, 38  
kioldódási profil 320  
királis vegyületek elválasztása (rezolválás) 90, 92, 94, 95  
— —, diasztereomer 2, 93-95  
— —, enantiomer 92, 94, 95  
— — rezgési spektroszkópiája 297, 298  
kirázásos módszer savanyú protonok megkülönböztetésére 384  
kiválasztási szabályok (IR és Raman) 269, 270, 303  
klasszifikációs módszerek 313-316  
Knox-egyenlet 6  
koaleszcenciapont, -hőmérséklet 382  
kocka 46  
koffein 257  
koherens anti-Stokes Raman-szóródás (CARS) 303  
kokristály 91, 116-118  
kollineáris 313, 318  
kolonnán kívüli zónaszélesítő hatások 9, 17  
kombinációs rezgés (kombináció) 309, 310  
— sávok 265  
konfokális optika 293  
konformáció, konformációs analízis 368, 370, 375, 384, 404  
konformációs polimorfia 185  
korrelációs 2D spektroszkópia 304, 305  
— táblázatok 363  
korrugáció 133, 134  
kovariancia 319  
Kozeny–Carman-összefüggés 28  
kölsönös kizárási szabály 269  
kötődésvizsgálat 406, 407  
közeltér-kölsönhatás elve 123  
közvetett meghatározás 236  
kristályosztály 171, 172, 197  
kristályrendszer 172, 178, 184  
kromofor csoport 243, 246

küvetta 245, 246, 252, 253, 256, 259  
kvadrupólusmomentum 353  
kvantitatív NMR (qNMR) 404  
kvarcküvetta 253

## L

L<sup>1</sup>vov-platform 230  
Lambert–Beer-törvény 245, 248, 249, 261  
Larmor-frekvencia, -precesszió 337-341,  
343, 345  
látens változó (faktor) 314, 318, 319  
látszólagos tényérszám 10  
LC-NMR 390, 407-409  
lineáris elúciós módszer 4  
— korrelációs koeficiens (R) 321  
— regresszió 318  
lock 385, 389  
log *D*-pH 43  
log *P* 42  
Lorentz-jelalak, -függvény 341

## M

MAB 168, 169  
mágnes (permanens, elektro-, szupravezető)  
333, 387  
mágneses (NMR-aktív) magok 332, 379  
— ekvivalencia 353  
— momentum, makroszkopikus  
mágneszettség 332, 337, 338, 341, 344,  
388  
— szuszceptibilitás 359  
— tér, térerősség, mező 333, 337, 345, 357,  
358, 386-390  
mágnesesen inaktív magok 332, 403  
Mahalanobis-távolság 313, 314

MALDI 153, 154, 158, 169, 170  
maradék predikciós eltérés (RPD) 321  
második generációs monolit 8, 27  
Massmann-kemence 230  
McConnell-egyenlet 359  
memóriaeffektus 231  
mérési tartomány 242  
mesterséges neurális hálózat (ANN) 319  
mezóméria 373, 374  
MFM 140  
mikroszkóp 121, 131, 139-141  
—, IR- és Raman- 290, 293  
—, optikai 121, 140  
Miller-index 180  
mintacső forgatása 386, 388  
MIR (közép infravörös) spektroszkópia 307,  
310, 311, 316  
moláris abszorpció együttható 245, 247, 248  
molekuláris mozgások NMR-vizsgálata  
(DNMR) 381, 384, 390  
molekulatopológia, atom-atom konnektivitás  
399, 400, 403  
molekulatömeg 146, 147, 150, 154, 155  
molekulavegyület 90, 91, 116, 117  
monoklonális antitest 324  
monokromatikus 249, 251  
monolit 26  
morfológia 133, 135, 139  
morfortrópia 184, 197, 210  
multinukleáris NMR 409

## N

nagyítás 121, 122, 128  
nehézatomb-effektus 376  
nemlineáris Raman-szóródás 302  
— regresszió 314, 318, 319  
neutrondiffrakció 174, 175



NIR (közeli infravörös) spektroszkópia 307, 310, 313, 318, 319, 322, 323, 326-328  
nitrogén kémiai eltolódások és N,H  
csatolások mérése 2D módszerekkel 403  
NMR-érzékenység 342, 371, 388, 408  
NMR-időskála 382, 383  
NMR-mérőfej 387, 389, 390  
NMR-szerkezetbizonyítás menete 403  
non-contact üzemmód 138  
normálrezgés 269, 309  
nullaponti rezgési energia 268

## O

oldószer- (víz-), jelelnyomás (WEFT) 342-344, 408  
oldószer effektus, -hatás, ASIS 355, 374, 376  
on-line 307, 311, 312, 321-324, 327  
orto-, meta-, para-csatolás  
benzolszármazékokban 366, 370  
ortogonális szelektivitás 62  
oszillátor rezgési frekvencia 307-310  
Overhauser-hatás (NOE) 377, 379-381, 394, 395, 402, 404

## P

paper trial 325  
paramágneses eltolódás (downfield shift) 357, 358, 360, 361  
páztázó 121, 123, 124, 128, 130, 131, 134, 136, 139, 140  
PDM 141  
 $\pi$ -elektron 243  
piezokerámia 125, 128  
 $pK_a$  42  
pneumatikus porlasztó 228

polár távolság 313  
polarizáló tér 337  
polimorf módosulatok mennyiségi mérése 87-90  
polimorfia 81-89, 173, 183-185, 187, 188, 190, 205, 206, 316  
— vizsgálata DSC-vel 85-87  
— (mono- és enantiotrópia) 82-86  
pontos tömeg 150, 151  
potenciálgát 131, 132, 136  
potenciális energia 266  
predikció standard hibája (SEP) 320  
primitív rács 172  
pulzus, kemény-, lágy-, pulzusgerjesztés 338-343, 377, 388  
pulzusszekvencia 344, 345, 377, 402

## Q

quality by design (QbD) 42, 56

## R

rádiófrekvencia (RF) 332, 333, 337, 387  
Raman optikai aktivitás (ROA) 297  
Raman-spektroszkópia 263, 264, 286, 293, 303, 307, 310, 311, 316, 319  
Rayleigh-szóródás 263, 264, 302  
reciprokrács 177, 179  
redukált elméleti tényérmagasság 6  
— tömeg 267, 268, 272, 308  
referens anyag 347, 386  
reflexiós rács 252  
— technikák 283  
relaxáció (longitudinális, transzverzális) 336, 339, 343, 344, 380, 406  
relaxációs átmenet 98

részleges legkisebb négyzetek (PLS)  
  módszere 319, 320, 323  
rétegvastagság 144  
rezgési (vibrációs) spektroszkópia 307  
— cirkuláris dikroizmus (VCD) 297  
— frekvencia 307-310  
— optikai aktivitás (VOA) 297  
— spektrumok skálázása (SQM-módszer)  
  270  
rezolválás ld. királis vegyületek elválasztása  
rezonanciafrekvencia 333-335, 338, 345,  
  347, 348, 389  
ritkaföldfém 256, 259  
robosztusságvizsgálat 51  
rotor 386, 388  
rovarsejtes fermentáció 323, 324  
röntgendiffrakció 171, 173, 174, 185  
RPLC 42  
rudimentális spektrum 352, 355  
rugólapka (cantilever) 137, 139-141

## S

Schrödinger-egyenlet 268  
SCM 140  
sebességi elmélet 4  
SFC 60  
shift-reagens, -technika 406  
Shigemi-cső 390  
shim, shim-tekercs, shimelés 388, 389  
simítás (smoothing) 313  
SKM 140  
SNOM 123, 140  
spektrofotométer 240, 242, 249, 251, 252,  
  254-257, 259, 260, 262  
spektroszkópia 239-242, 244-249, 251-254  
spektrum 239, 240, 242-244, 247-251, 253,  
  256, 257

spektrumatlasz 248  
spin, spinkvantumszám 332, 334, 336, 337,  
  339-341, 343-345, 348, 349, 351, 352,  
  355, 371, 377, 378, 380, 381, 392, 396  
spin-rács relaxáció 336, 340, 341, 344  
spinrendszer 348, 353-355, 398  
—,  $A_2X_3$  349, 350, 353  
—,  $AA'XX'$ ,  $AA'BB'$  353, 354  
—, AB 351, 353  
—, ABC 354  
—, ABX 352, 353  
—, AMX 350, 352-355  
—, AX 349-351, 353-355, 378  
spin-spin csatolás (skaláris kölcsönhatás)  
  348, 355, 371, 377  
— relaxáció 340  
spin-tickling 377  
SPM 121-125, 127-131, 135, 141, 142, 144  
standard normál variancia (SNV) 317  
standardadagolás 234  
SThM 140  
STM 122, 125, 126, 128, 131-137, 139, 141,  
  142  
Stokes-szóródás 263, 264  
STS 136, 137

## SZ

szabad indukciós jel (FID) 340-342, 386, 390  
száloptika 307, 311, 321, 323, 327  
szelektív proton-proton (homonukleáris)  
  lecsatolás 377  
szelektivitási tényező 3  
szélessávú (broad band, BB) lecsatolás 377-  
  379, 381, 403  
szén nanocső 136, 137  
szén-dioxid 61  
szerkezeti amplitúdó 180  
— tényező 179-181

szerves modifikátor 62  
szilárd oldat (elegykristály) 90, 91  
szimmetriacentrum 175  
szimuláció 46  
szimultán termoanalitikai mérés (TG/DSC, TG/DTA) 101, 102, 108-112, 114, 116, 117  
szinkron spektrumok 304  
szinton 185, 193  
szolvát (kristály—, oldószerzárvány) 107, 184, 185  
szoros illeszkedés 172, 184, 187, 204  
szorzatszabály 350  
sztereokémia 356, 364, 366, 374, 380  
szupramolekuláris 174, 183, 185, 187  
— vegyület borkősavval és származékaival 94, 95  
— vegyület teofillinnel 116, 117  
szuszpenziós technika 282

## T

támogató vektor módszer (SVM) 319  
tandem tömegspektrometria 159  
tapping üzemmód 138  
tautoméria (NMR-vizsgálata) 385  
távolható (long range) csatolás 370  
telítés 335, 343, 344, 380, 406  
teljesen porózus 2  $\mu\text{m}$  alatti töltet 2, 8, 18  
teofillin 116-118  
tér- ( $\gamma$ -gauche) effektus 373-375  
terahertz-spektroszkópia 265, 295  
térben elcsúsztatott Raman-spektroszkópia (SORS) 293  
tércsoport 172, 178

téren át ható (through space) csatolás 343, 370  
térgradiens 388, 390, 392  
térhomogenitás, inhomogenitás 341, 386-388  
térképezés 290, 293  
természetes izotópgyakoriság 334, 351, 371  
termogravimetria (TG) 70, 71, 73, 74, 110  
termomérleg 73, 74  
terner összetétel 47, 50  
térstabilitás 387  
tér szerkezet, molekulageometria, izoméria 355, 356, 360, 361, 365, 367, 368, 375, 402, 404  
tervezett minőség (QbD) 324, 325  
testvérszerkezet 190  
tetramer 193, 198-200  
 $t_G$ - $T$ -pH 3D modell 49  
 $t_G$ - $T$ - $t_C$  3D modell 50  
torzítás (bias) 321  
többszörös szóródási korrekció (MSC) 317  
tömegdefektus 150  
tömegeffektus (H-D szubsztitúció) 268  
tömegspektrometria 145-149, 153, 159, 161, 162, 164-170  
transzláció 172, 175  
transzmissziós technikák 282  
transzmittancia 245, 246  
triád 212  
TriPod 125  
tűszonda 128, 131, 137  
tűszondás spektroszkópia 136

## U

UHPLC 3, 6, 10  
UHPSFC 63

## Ü

üvegesedési átmenet 97-99  
üvegküvetta 253

## V

vájtkatód-lámpa 227  
validálás 260  
valós idejű mérés 325  
változó hőmérsékletű NMR-mérés  
(VTNMR) 381, 382, 390  
van Deemter-összefüggés 5  
van der Waals-erő 137, 140  
van't Hoff-egyenlet 39  
vegyérték-izoméria 385  
vegyértékrezgés 310, 319  
vektor (Patterson)-módszer 180  
véletlen izokronia 355, 356

vibrációs energia 308, 309  
— kvantumszám 308-310  
vicinális csatolás 365-367  
vizontkoordináció 276  
visszacsatolt szabályzókör 128  
vízállapot 320  
volfrámlámpa 252  
vonalkiszélesedés 225-227

## W

Woodward-szabály 251  
W-típusú csatolás, felhasadás („W-pattern”)  
370

## Z

zavaró hatás 231-234  
Zeeman-felhasadás, -nívók 332, 337  
zéró defekt 328

## **A „Gyógyszerkutatás műszeres módszerei” c. könyv szerzői:**

**Bombicz Petra** PhD vegyész-mérnök, a Magyar Tudományos Akadémia Természettudományi Kutatóközpontjának tudományos főmunkatársa, kutatócsoport-vezető. Szakterülete a kémiai krisztallográfia, fő kutatási témái: szupramolekuláris kémia, crystal engineering, polimorfia-izostrukturalitás.

**Drahos László** PhD vegyész, a Magyar Tudományos Akadémia Természettudományi Kutatóközpontjának tudományos főmunkatársa. Fő kutatási témája a tömegspektrometria alapú (gliko)proteomika.

**Fábián László** PhD vegyész, lecturer a University of East Anglia egyetemen. Szakterülete a kémiai krisztallográfia, fő kutatási területe a szerves anyagok szerkezeti kémiája.

**Fekete Jenő** PhD vegyész-mérnök, a BME Szervetlen és Analitikai Kémiai Tanszékének emeritusz professzora. Fő kutatási területe az elválasztás-technikai módszerek fejlesztése, ezen belül a gyors folyadékkromatográfias módszerek elméleti hátterének és gyakorlati alkalmazási lehetőségeinek felderítése.

**Fekete Szabolcs** PhD vegyész-mérnök, analitikus szakmérnök, a Genfi Egyetem, Gyógyszerész Kar, Gyógyszer-analitikai laboratórium tudományos munkatársa. Fő kutatási terület: a folyadékkromatográfia, valamint a gyógyszer- és fehérjeanalitika.

**Gergely Szilveszter** PhD biomérnök, a BME Vegyész-mérnöki és Biomérnöki Kar Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudományi Tanszékének docense. Fő kutatási területe kemometriai eszközökkel infravörös spektroszkópiai alkalmazások fejlesztése, főként a mezőgazdaság, ill. élelmiszer- és gyógyszeripar számára.

**Kálmán Alajos** vegyész a Magyar Tudományos Akadémia Természettudományi Kutatóközpontja Szerves Kémiai Intézetének Széchenyi-díjas nyugalmazott tudományos osztályvezetője és kutatóprofesszora, az MTA rendes tagja, az ELTE TTK címzetes egyetemi tanára. Kutatási területe

a röntgenkristallográfia, fő kutatási témái a szupramolekuláris kémia, s ezen belül a morfortrópia, polimorfia és az izostrukturalitás.

**Kékedy-Nagy László** DSc vegyész, a Babeş-Bolyai Tudományegyetem, Kémia és Vegyész-mérnöki Kar, Analitikai Kémiai Tanszékének nyugalmazott docense, a Sapientia Egyetem óraadó tanára. Kutatási területei: elektrokémiai szenzorok előállítása, analitikai meghatározások automatizálása, analitikai műszertervezés és -gyártás, új mikroanalitikai eljárások és módszerek kidolgozása, környezeti minták nehézfém-tartalmának meghatározása atomspektrometriás eljárásokkal és a lángspektrometriás eljárások optimalizálása.

**Kormány Róbert** vegyész, mesterszintű kromatográfiai szakanalitikus, az Egis Gyógyszergyár Zrt. HP analitikai laboratórium vezetője. Fő kutatási területe a folyadék-kromatográfiai módszerfejlesztés számítógépes szimulációval, Quality by Design a gyógyszeranalitikában.

**Kürti Jenő** DSc fizikus, az ELTE TTK Fizikai Intézet, Biológiai Fizika Tanszékének tanszékvezető egyetemi tanára. Fő kutatási területe: szilárdtest fizika, molekulafizika, szén nanoszerkezetek rezgési tulajdonságainak elméleti vizsgálata.

**Ludányi Krisztina** PhD vegyész-mérnök, a Semmelweis Egyetem, Gyógyszerészet Intézet egyetemi docense. Fő kutatási területei: biológiai és gyógyszer-technológiai rendszerek analitikai vizsgálata kromatográfiai és tömegspektrometriai módszerekkel.

**Madarász János** PhD vegyész-mérnök, a BME habilitált docense. Fő kutatási területei: analitikai kémia, szilárdtest-kémia, termikus analízis, fejlődőgáz-elemzés (TG-MS, TG-FTIR), por-röntgendiffrakció, FTIR-spektroszkópia, szerves és szervetlen anyagok termikus bomlási termékeinek, folyamatainak és mechanizmusának felderítése, rezolválási fázisdiagramok összeállítása XRD-, FTIR- és DSC-mérések alapján.

**Meszlényi Gábor** PhD vegyész-mérnök, címzetes egyetemi docens (BME) a Richter Gedeon Vegyészeti Gyár Nyrt. Kutatási Analitikai Osztályának senior kutatója. Fő kutatási területe az IR- és UV/VIS-spektroszkópiai módszerek felhasználása a gyógyszeranalitikában, potenciometrikus titrálások kidolgozása a gyógyszerhatóanyagok és intermedierek összetételének és hatóanyag-tartalmának meghatározására.

**Nagy Péter** PhD fizikus, az MTA-TTK Anyag és Környezetkémiai Intézet tudományos főmunkatársa. Fő kutatási területei: nano-rétegek, nano-szerkezetek strukturális, morfológiai és mechanikai vizsgálata.

**Pokol György** DSc vegyész-mérnök, a BME Szeretlen és Analitikai Kémia Tanszékének egyetemi tanára. Fő kutatási területe: szilárd anyagok szerkezetének, fázisátalakulásainak és kémiai reakcióinak leírása.

**Ritz Ferenc** vegyész-mérnök, gazdasági mérnök, környezetvédelmi analitikus szakmérnök, a BME VBK önkéntes munkaszerződéses szak-tanácsadója. Szakterülete az IR- és UV/VIS-spektroszkópia felhasználása a környezetvédelmi analitikában.

**Salgó András** DSc vegyész-mérnök, a BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszer-tudományi Tanszékének tanszékvezető egyetemi tanára. Fő kutatási területe az élelmiszertudomány, s ezen belül a közeli infravörös spektroszkópia.

**Sánta Zsuzsanna** PhD vegyész-mérnök, a Richter Gedeon Vegyészeti Gyár Nyrt, Szerkezetkutatási osztályának kutató-fejlesztő kiemelt munkatársa. Kutatási területe: kismolekulás szerkezetfelderítés NMR-spektroszkópiával.

**Sohár Pál** vegyész-mérnök, az ELTE TTK Kémiai Intézet Széchenyi-díjas emeritusz professzora, az MTA rendes tagja. Kutatási területe a kémiai szerkezetkutatás, a kémiai vegyületek térszerkezetének, konformációjának vizsgálata IR- és NMR-spektroszkópiai módszerekkel. Az IR- és NMR-spektroszkópia első magyar nyelvű monográfiájának társszerzője, illetve szerzője, az NMR-spektroszkópia egyetemi oktatásának magyarországi bevezetője és első előadója.

**Szakács Zoltán** PhD vegyész, a Richter Gedeon Nyrt. Szerkezetkutatási osztályának senior kutató-fejlesztője. Szakterülete a gyógyszerhatóanyagok, intermedierek és bioaktív vegyületek szerkezet- és tisztaságvizsgálata oldatfázisú NMR-spektroszkópiával, protonálódási és ciklodextrin komplexképzési egyensúlyok vizsgálata spektroszkópiai, titrálásos és kapilláris elektroforézis módszerekkel.

**Szántay Csaba**, ifj., DSc vegyész-mérnök, a Richter Gedeon Nyrt. Szerkezetkutatási osztályának osztályvezetője. Szakterülete a gyógyszer-

hatóanyagok, intermedierek és bioaktív vegyületek szerkezet- és tisztaságvizsgálata oldatfázisú NMR-spektroszkópiával; az NMR-spektroszkópia fizikai elméletének kutatása.

**Tarczay György** DSc vegyész, az ELTE TTK Kémiai Intézet docense. Szakterülete a molekuláspektroszkópia, fő kutatási témái: biomolekulák, valamint asztrokémiai szempontból érdekes molekulák vizsgálata IR-, Raman-, kiroptikai és lézeres spektroszkópiai módszerekkel.

**Vékey Károly** DSc vegyész, az MTA Természettudományi Kutatóközpont Műszerközpontjának tudományos osztályvezetője. Szakterülete és fő kutatási témái: tömegspektrometria, glikoproteomika.