

Σχολή Θετικών Επιστημών και Τεχνολογίας

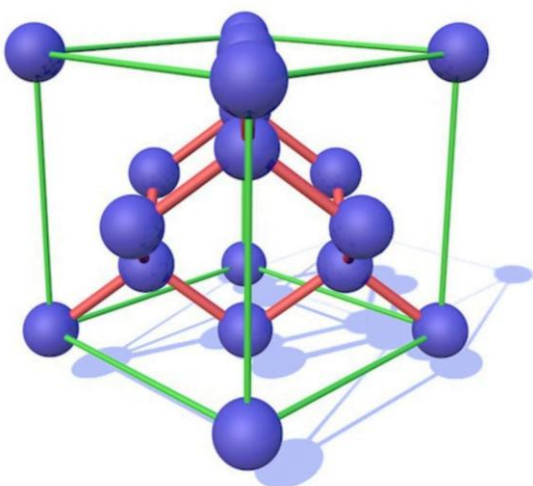
ΠΜΣ: Χημική και Βιομοριακή Ανάλυση

Διπλωματική Εργασία

**«Προσδιορισμός του πολυμορφισμού της δραστικής ουσίας  
Παρακετάμης με Φασματοσκοπία Raman, Φασματομετρία IR  
και Περίθλαση Ακτίνων-X»**

Νεφέλη Καμμένου

Επιβλέπουσα καθηγήτρια: Μαλβίνα Όρκουλα



Πάτρα, Ιανουάριος 2025

Η παρούσα εργασία αποτελεί πνευματική ιδιοκτησία της φοιτήτριας («συγγραφέας/δημιουργός») που την εκπόνησε. Στο πλαίσιο της πολιτικής ανοικτής πρόσβασης η συγγραφέας/δημιουργός εκχωρεί στο ΕΑΠ, μη αποκλειστική άδεια χρήσης του δικαιώματος αναπαραγωγής, προσαρμογής, δημόσιου δανεισμού, παρουσίασης στο κοινό και ψηφιακής διάχυσής τους διεθνώς, σε ηλεκτρονική μορφή και σε οποιοδήποτε μέσο, για διδακτικούς και ερευνητικούς σκοπούς, άνευ ανταλλάγματος και για όλο το χρόνο διάρκειας των δικαιωμάτων πνευματικής ιδιοκτησίας. Η ανοικτή πρόσβαση στο πλήρες κείμενο για μελέτη και ανάγνωση δεν σημαίνει καθ' οιονδήποτε τρόπο παραχώρηση δικαιωμάτων διανοητικής ιδιοκτησίας του συγγραφέα/δημιουργού ούτε επιτρέπει την αναπαραγωγή, αναδημοσίευση, αντιγραφή, αποθήκευση, πώληση, εμπορική χρήση, μετάδοση, διανομή, έκδοση, εκτέλεση, «μεταφόρτωση» (downloading), «ανάρτηση» (uploading), μετάφραση, τροποποίηση με οποιονδήποτε τρόπο, τμηματικά ή περιληπτικά της εργασίας, χωρίς τη ρητή προηγούμενη έγγραφη συναίνεση της συγγραφέας/δημιουργού. Η συγγραφέας/δημιουργός διατηρεί το σύνολο των ηθικών και περιουσιακών του δικαιωμάτων.

**«Προσδιορισμός του πολυμορφισμού της δραστικής ουσίας  
Πιρακετάμης με Φασματοσκοπία Raman, Φασματομετρία IR  
και Περίθλαση Ακτίνων-X»**

Νεφέλη Καμμένου

Επιτροπή Επίβλεψης Διπλωματικής Εργασίας

Επιβλέπουσα Καθηγήτρια:

Μαλβίνα Όρκουλα

Επίκουρος καθηγήτρια Ενόργανης  
Φαρμακευτικής Ανάλυσης

Τμήμα Φαρμακευτικής, Πανεπιστήμιο  
Πατρών

Συν-Επιβλέπων Καθηγητής:

Χρήστος Κοντογιάννης

Καθηγητής Ενόργανης Ανάλυσης

Τμήμα Φαρμακευτικής, Πανεπιστήμιο  
Πατρών

Πάτρα, Ιανουάριος 2025

Θα ήθελα αρχικά να εκφράσω τις ευχαριστίες μου προς την επιβλέπουσα μου, κυρία Μαλβίνα Όρκουλα, Επίκουρο Καθηγήτρια Ενόργανης Φαρμακευτικής Ανάλυσης του Τμήματος Φαρμακευτικής του Πανεπιστημίου Πατρών, για την πολύτιμη καθοδήγηση και την υποστήριξή της καθ' όλη τη διάρκεια της ερευνητικής διαδικασίας, οι οποίες υπήρξαν καθοριστικές για την εξέλιξη της εργασίας μου. Ακόμη, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον συνεπιβλέπων της διπλωματικής μου κύριο Κοντογιάννη Χρήστο, Καθηγητή Ενόργανης Ανάλυσης του Τμήματος Φαρμακευτικής του Πανεπιστημίου Πατρών για την άμεση ανταπόκρισή του σε οποιαδήποτε βοήθεια χρειάστηκα.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά το προσωπικό του μεταπτυχιακού προγράμματος "Χημική και Βιομοριακή Ανάλυση" για την αμέριστη στήριξή του και την άριστη οργάνωση του προγράμματος, που μου επέτρεψε να αποκτήσω σημαντικές γνώσεις και δεξιότητες στον τομέα. Η βοήθεια και η καθοδήγησή τους σε όλα τα στάδια της εκπαιδευτικής μου πορείας υπήρξαν ανεκτίμητες.

Θα ήθελα, τέλος, να εκφράσω την ευγνωμοσύνη μου στην οικογένειά μου αλλά και τους φίλους μου, που υπήρξαν το μεγαλύτερο στήριγμα σε αυτήν την προσπάθεια, προσφέροντάς μου δύναμη και κατανόηση και παρέχοντάς μου αδιάκοπη υποστήριξη και ενθάρρυνση σε κάθε μου βήμα.

## Περίληψη

Ο πολυμορφισμός είναι η ικανότητα ορισμένων ενώσεων να απαντώνται σε διαφορετικές κρυσταλλικές μορφές στη στερεή κατάσταση, δηλαδή να παρουσιάζουν διαφορετική διάταξη των ατόμων ή μορίων τους εντός του κρυσταλλικού τους πλέγματος. Θεμελιώδης μονάδα του κρυσταλλικού πλέγματος είναι η μοναδιαία κυψελίδα (unit cell), η οποία χαρακτηρίζεται από ορισμένες παραμέτρους, όπως είναι τα στοιχεία συμμετρίας της, οι πλευρές της ( $a$ ,  $b$ ,  $c$ ) και οι γωνίες τις ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ). Οι παράμετροι αυτοί κατατάσσουν τη μοναδιαία κυψελίδα και κατ' επέκταση όλη την κρυσταλλική δομή μιας ουσίας σε επτά βασικές κατηγορίες, οι οποίες αποκαλούνται κρυσταλλικά συστήματα. Τα επτά βασικά κρυσταλλικά συστήματα είναι το κυβικό (cubic), το τετραγωνικό (tetragonal), το ορθορομβικό (orthorhombic), το μονοκλινές (monoclinic), το εξαγωνικό (hexagonal), το ρομβοεδρικό (rhombohedral) και το τρικλινές (triclinic). Ανάλογα με την τοποθέτηση των ατόμων ή μορίων της ουσίας εντός της μοναδιαίας κυψελίδας, τα παραπάνω κρυσταλλικά συστήματα αναλύονται περαιτέρω στα πλέγματα Bravais.

Ο πολυμορφισμός αποτελεί μία ιδιότητα της πλειοψηφίας των οργανικών ενώσεων και των περισσότερων από των μισών φαρμακευτικών δραστικών ουσιών (APIs). Η ιδιότητα αυτή έχει αξιοποιηθεί ιδιαίτερα από τη φαρμακευτική βιομηχανία για την ανάπτυξη και δημιουργία νέων βελτιωμένων φαρμάκων, καθώς η αλλαγή στη μοριακή διάταξη μιας ουσίας έχει ως αποτέλεσμα την εμφάνιση διαφοροποιημένων χαρακτηριστικών όπως είναι η διαλυτότητα, η σταθερότητα, ο ρυθμός διάλυσης, η βιοδιαθεσιμότητα κ.ά. Για το σκοπό αυτό έχουν αναπτυχθεί ποικίλες τεχνικές και έχει μελετηθεί πληθώρα δραστικών ουσιών.

Στην παρούσα εργασία παρουσιάζονται τρεις ιδιαίτερα διαδεδομένες και βασικές τεχνικές που έχουν χρησιμοποιηθεί για τη μελέτη του πολυμορφισμού δραστικών φαρμακευτικών ουσιών, η περίθλαση ακτίνων X (XRD), η φασματομετρία υπέρυθρου (IR) και η φασματοσκοπία Raman. Η έρευνα επικεντρώνεται στη φαρμακευτική δραστική ουσία Πιρακετάμη, το βασικό συστατικό ενός νοοτροπικού φαρμακευτικού σκευάσματος, με πέντε αναγνωρισμένα πολύμορφα (FI-FV) και έναν νέο υπό μελέτη πολυμορφισμό (FVI). Παρατίθενται αποτελέσματα πειραματικών μελετών που πραγματοποιήθηκαν για τη μελέτη των πολυμόρφων της Πιρακετάμης μέσω των τριών προαναφερθέντων τεχνικών, ενώ στο τέλος πραγματοποιείται σύγκριση μεταξύ των τεχνικών αυτών όσον αφορά την ικανότητα

διάκρισης μεταξύ των διαφόρων κρυσταλλικών μορφών της ουσίας καθώς και ποσοτικοποίησής τους.

### **Λέξεις - Κλειδιά**

Πολυμορφισμός, πολύμορφα, κρυσταλλικές μορφές, κρυσταλλικά πλέγματα, πλέγματα Bravais, φαρμακευτικές δραστικές ουσίες (APIs), φασματομετρία υπέρυθρου (IR), περίθλαση ακτίνων X (XRD), φασματοσκοπία Raman, Πιρακετάμη.

# “Determination of the polymorphism of the active substance Piracetam using Raman Spectroscopy, IR Spectroscopy, and X-Ray Diffraction.”

Nefeli Kammenou

## Abstract

Polymorphism is the ability of certain compounds to exist in different crystalline forms in the solid state, meaning that they exhibit different arrangements of their atoms or molecules within their crystalline lattice. The fundamental unit of the crystalline lattice is the unit cell, which is characterized by certain parameters, such as its symmetry elements, sides (a, b, c) and angles ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ). These parameters classify the unit cell and, consequently, the entire crystalline structure of a substance into seven basic categories known as crystal systems. The seven primary crystal systems are the cubic, tetragonal, orthorhombic, monoclinic, hexagonal, rhombohedral and triclinic. Depending on the positioning of the atoms or molecules of the substance within the unit cell, these crystal systems are further analyzed into Bravais lattices.

Polymorphism is a characteristic of the majority of organic compounds and more than half of active pharmaceutical ingredients (APIs). It has been particularly utilized by the pharmaceutical industry for the development and creation of new improved drugs, as changes in the molecular arrangement of a substance result in differentiated characteristics such as solubility, stability, dissolution rate, bioavailability and more. For this purpose, various techniques have been developed and a many active substances have been studied.

The current work presents three fundamental and widely used techniques, used in the study of the polymorphism of active pharmaceutical ingredients: X-ray diffraction (XRD), infrared spectroscopy (IR) and Raman spectroscopy. The research focuses on the active pharmaceutical ingredient Piracetam, the primary component of a nootropic pharmaceutical product, which has five recognized polymorphs (FI-FV) and a new polymorph under study (FVI). Results from experimental studies conducted to investigate the polymorphs of Piracetam using the aforementioned techniques are presented and at the end a comparison

is made between these techniques concerning their ability to distinguish between the different crystalline forms of Piracetam as well as their ability of quantification.

## **Keywords**

Polymorphism, polymorphs, crystal structures, crystalline system / lattice, Bravais lattices, API(s), infrared spectroscopy (IR), X-Ray diffraction (XRD), Raman spectroscopy, Piracetam



## Περιεχόμενα

Περίληψη.....	v
Abstract.....	vii
Περιεχόμενα .....	ix
Κατάλογος Εικόνων / Σχημάτων .....	x
Κατάλογος Πινάκων .....	xii
Συντομογραφίες & Ακρωνύμια.....	xiii
1. Φάρμακα και δραστικές ουσίες.....	1
1.1 Μορφές φαρμακευτικών δραστικών ουσιών .....	2
1.1.1 Κρυσταλλικά συστήματα φαρμακευτικών δραστικών ουσιών.....	4
<i>Κρυσταλλικά συστήματα και κρυσταλλικές τάξεις</i> .....	4
<i>Άξονας περιστροφικής συμμετρίας</i> .....	5
<i>Πλέγματα Bravais</i> .....	7
<i>Κρυσταλλικά επίπεδα</i> .....	8
1.2 Πολυμορφισμός φαρμακευτικών δραστικών ουσιών .....	10
2. Μελέτη των πολυμορφισμών δραστικών ουσιών φαρμάκων .....	16
2.1 Αναλυτικές τεχνικές για τη μελέτη του πολυμορφισμού των φαρμακευτικών δραστικών ουσιών.....	16
2.1.1 Η τεχνική της Φασματοσκοπίας.....	18
<i>Περίθλαση Ακτίνων Χ (XRD)</i> .....	18
<i>Φασματομετρία Υπέρυθρου (IR)</i> .....	23
<i>Φασματοσκοπία Raman</i> .....	29
2.2 Μελέτη των πολυμορφισμών της Πιρακετάμης.....	35
2.2.1 Πιρακετάμη και πολυμορφισμοί .....	36
2.2.2 Ποιοτική ανάλυση των πολυμορφισμών της Πιρακετάμης μέσω XRD, IR και Raman.....	41
<i>Εφαρμογή της XRD (XRPD)</i> .....	41
<i>Εφαρμογή της IR (NIR &amp; MIR)</i> .....	44
<i>Εφαρμογή της Raman (BR &amp; TRS)</i> .....	46
2.2.3 Ποσοτική ανάλυση των πολυμορφισμών της Πιρακετάμης μέσω XRD, IR και Raman .....	50
2.2.4 Σύγκριση των τριών τεχνικών .....	53
2.2.5 Συμπεράσματα.....	56
Βιβλιογραφία.....	58

## Κατάλογος Εικόνων / Σχημάτων

Εικόνα 1: Μορφές φαρμακευτικών προϊόντων και παραδείγματα φαρμακευτικών σκευασμάτων που ανήκουν σε κάθε κατηγορία .....	2
Εικόνα 2: Σχηματική αναπαράσταση των στερεών μορφών των φαρμακευτικών δραστικών ουσιών .....	3
Εικόνα 3: Μοναδιαία κυψελίδα κρυστάλλου (unit cell). Α. Πλευρές (a,b,c) και γωνίες (α,β,γ) της μοναδιαίας κυψελίδας, Β. Παράδειγμα τοποθέτησης ατόμων στη μοναδιαία κυψελίδα, Γ. Μοναδιαία κυψελίδα εντός του κρυσταλλικού πλέγματος.....	4
Εικόνα 4: Δισδιάστατα παραδείγματα των αξόνων περιστροφικής συμμετρίας (C <sub>1</sub> -C <sub>6</sub> ).....	6
Εικόνα 5: Κρυσταλλικά πλέγματα κατά Bravais .....	7
Εικόνα 6: Δείκτες Miller (hkl): Διαστάσεις μοναδιαίας κυψελίδας και η σχέση τους με τα πλεγματικά σημεία από όπου διέρχεται ένα επίπεδο.....	9
Εικόνα 7: Δείκτες Miller (hkl) πλεγματικών σημείων κυβικού κρυσταλλικού συστήματος .....	10
Εικόνα 8: Αναπαράσταση της σχέσης μεταξύ των θερμοδυναμικών και θερμοκινητικών παραμέτρων στις μετατροπές στερεών καταστάσεων .....	12
Εικόνα 9: Χημικός τύπος και δομή του μορίου της Παρακεταμόλης.....	13
Εικόνα 10: Μοναδιαία κυψελίδα της κρυσταλλικής μορφής I (Α) και II (Β) της Παρακεταμόλης.....	14
Εικόνα 11: Περίθλαση ακτίνων X από κρυσταλλικό πλέγμα .....	20
Εικόνα 12: Περιθλασιογράμματα των πολυμόρφων I και II της Παρακεταμόλης.....	21
Εικόνα 13: Βασική διάταξη ενός περιθλασίμετρου XRD.....	23
Εικόνα 14: Φάσματα Απορρόφησης IR των πολυμόρφων I (1) και II (2) της Παρακεταμόλης.....	27
Εικόνα 15: Φάσμα διαπερατότητας IR της Παρακεταμόλης.....	27
Εικόνα 16: Διάταξη ενός βασικού φασματομέτρου FTIR .....	29
Εικόνα 17: Το φαινόμενο της σκέδασης Raman και της σκέδασης Rayleigh .....	31
Εικόνα 18: (Α) Προέλευση φασμάτων Raman, (Β) Κορυφές Stokes και anti-Stokes .....	32
Εικόνα 19: Φάσματα Raman των πολυμόρφων I (FI) και II (FII) της Παρακεταμόλης ....	33
Εικόνα 20: Βασική οργανολογία της φασματοσκοπίας Raman.....	34
Εικόνα 21: Μεθοδολογίες Raman. (Α) Raman οπισθοσκέδασης (BR), (Β) Raman διαπερατότητας (TRS) .....	35
Εικόνα 22: Χημικός τύπος και δομή (δισδιάστατη και τρισδιάστατη) της Πιρακετάμης ..	36
Εικόνα 23: Δομή μοναδιαίας κυψελίδας του πολυμόρφου FII (Α) και FIII (Β) της Πιρακετάμης.....	38
Εικόνα 24: Κρυσταλλική δομή μοναδιαίας κυψελίδας των Πολυμορφισμών FI (Α), FIV (Β) και FV (Γ) της Πιρακετάμης .....	39
Εικόνα 25: Κρύσταλλοι των πολυμόρφων FII, FIII και FVI της Πιρακετάμης, όπως καταγράφηκαν μέσω SEM .....	41
Εικόνα 26: Περιθλασιόγραμμα XRPD των δύο πολυμόρφων FII και FIII της Πιρακετάμης.....	42
Εικόνα 27: Σύγκριση των περιθλασιογραμμάτων XRPD των πολυμόρφων FI (α) - FV (ε) με εκείνα του πολυμόρφου FIV σε αιθανόλη (f) και ισοπροπανόλη (g)....	43
Εικόνα 28: Φάσματα NIR απορρόφησης των πολυμόρφων FII και FIII της Πιρακετάμης, όπως αυτά καταγράφηκαν από ανάλυση μιγμάτων FII-FIII.....	44

Εικόνα 29: Φάσματα NIR απορρόφησης των πολυμόρφων FII και FIII της Πιρακετάμης, όπως αυτά καταγράφηκαν από ανάλυση μιγμάτων (δισκίων) FII-FIII .....	45
Εικόνα 30: Φάσματα ATR FTIR διαπερατότητας των πολυμόρφων FII (a), FIII (b) και FVI (c).....	46
Εικόνα 31: Φάσματα Raman των πολυμορφισμών FII και FIII της Πιρακετάμης, όπως αυτά καταγράφηκαν από ανάλυση μιγμάτων FII-FIII. ....	47
Εικόνα 32: Φάσματα Raman των πολυμόρφων FII (b), FIII (a) και FVI σε IPrOH (c) και EtOH (e). Στα σχήματα (d) και (f) δίνονται τα φάσματα της FVI σε IPrOH και EtOH μετά από 6h και 15 min αντίστοιχα. ....	48
Εικόνα 33: Φάσματα Backscattering Raman των πολυμόρφων FII και FIII της Πιρακετάμης, όπως αυτά καταγράφηκαν από την ανάλυση μιγμάτων (δισκίων) FII-FIII. ....	49
Εικόνα 34: Φάσματα Transmission Raman των πολυμόρφων FII και FIII της Πιρακετάμης, όπως αυτά καταγράφηκαν από την ανάλυση μιγμάτων (δισκίων) FII-FIII. ....	49
Εικόνα 35: Καμπύλη Συσχέτισης της αναμενόμενης (predicted) και υπολογισμένης (measured) περιεκτικότητας της μορφής FII σε μίγματα FII-FIII των τεχνικών (A) XRPD, (B) NIR και (Γ) Raman, με τη χρήση PLS .....	52

## Κατάλογος Πινάκων

Πίνακας 1: Κρυσταλλικές τάξεις σύμφωνα με τα κρυσταλλικά συστήματα στα οποία ανήκουν .....	5
Πίνακας 2: Τα χαρακτηριστικά στοιχεία περιστροφικής συμμετρίας που ορίζουν τα 7 κρυσταλλικά συστήματα .....	6
Πίνακας 3: Τα 7 κρυσταλλικά συστήματα και τα πλέγματα κατά Bravais .....	8
Πίνακας 4: Φυσικοχημικές και φαρμακευτικές ιδιότητες των APIs που διαφέρουν μεταξύ των διαφόρων πολυμορφισμών μίας ουσίας .....	11
Πίνακας 5: Αναλυτικές τεχνικές που χρησιμοποιούνται συχνότερα για τον χαρακτηρισμό πολυμορφισμών φαρμακευτικών δραστικών ουσιών .....	17
Πίνακας 6: Φασματικές περιοχές υπέρυθρου .....	24
Πίνακας 7: Κρυσταλλογραφικά χαρακτηριστικά των κυρίαρχων πολυμορφισμών της Πιρακετάμης .....	39
Πίνακας 8: Σύγκριση της ικανότητας ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης της FII σε μίγματα FII-FIII ανάμεσα στις τρεις τεχνικές .....	51
Πίνακας 9: Σύγκριση των τιμών $R^2$ , RMSEC% και RMSEP% των τριών τεχνικών για την ποσοτικοποίηση της μορφής FII σε μίγματα FII-FIII .....	52
Πίνακας 10: Σύγκριση των τιμών $R^2$ , RMSEC% και RMSEP% των NIR, BR και TRS σχετικά με την ποσοτικοποίηση της μορφής FII σε δισκία FII-FIII .....	53
Πίνακας 11: Σύγκριση των ορίων ανίχνευσης (LOD) των NIR και TRS σχετικά με την ποσοτικοποίηση της μορφής FII σε δισκία FII-FIII .....	53

## Συντομογραφίες & Ακρωνύμια

ΚΝΣ	Κεντρικό Νευρικό Σύστημα
AFM	Atomic Force Microscopy (μικροσκοπία ατομικής δύναμης)
API	Active Pharmaceutical Ingredient (φαρμακευτική δραστική ουσία)
ATR	Attenuated Total Reflection (αποσβένουσα ολική ανάκλαση)
BR	Backscattering Raman (Raman οπισθοσκέδασης)
CCDC	Cambridge Crystallographic Data Centre
DSC	Differential Scanning Calorimetry (διαφορική θερμιδομετρία σάρωσης)
DTA	Differential Thermal Analysis (διαφορική θερμική ανάλυση)
EtOH	Ethanol (Αιθανόλη)
FI-FVI	Form I-VI (Κρυσταλλική μορφή I-VI)
FIR	Far Infrared Spectroscopy (φασματομετρία άπω υπέρυθρου)
FT	Fourier Transformation (μετασχηματισμός Fourier)
FTIR	Fourier Transformed Infrared Spectroscopy (φασματομετρία υπέρυθρου με μετασχηματισμό Fourier)
GABA	Νευροδιαβιβαστής γ-αμινοβουτυρικού οξέος
HSM	Hot-Stage Microscopy (μικροσκοπία θερμαινόμενου σταδίου)
IMC	Isothermal Microcalorimetry (ισοθερμική μικροθερμιδομετρία)
IPrOH	Isopropanol (Ισοπροπανόλη)
IR	Infrared spectroscopy (φασματομετρία υπέρυθρου)
LOD	Limit of Detection (όριο ανίχνευσης)
LOQ	Limit of Quantification (όριο ποσοτικοποίησης)
MIR	Middle Infrared Spectroscopy (φασματομετρία μέσου υπέρυθρου)
NIR	Near Infrared spectroscopy (φασματομετρία εγγύς υπέρυθρου)
NMR	Nuclear Magnetic Resonance spectroscopy (φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού)
PLM	Polarized Light Microscopy (πολωτική μικροσκοπία)
PLS	Partial Least Squares regression (παλινδρόμηση μερικών ελαχίστων τετραγώνων)
RMSEC%	% Root Mean Square Error of Calibration – % σφάλμα πρόβλεψης κατά τη βαθμονόμηση

RMSEP%	% Root Mean Square Error of Prediction – % σφάλμα πρόβλεψης κατά την εφαρμογή του μοντέλου
RT	Room Temperature (θερμοκρασία / συνθήκες περιβάλλοντος)
SCXRD	Single Crystal X-Ray Diffraction (περίθλαση ακτίνων X μονοκρυστάλλου)
SEM	Scanning Electron Microscopy (μικροσκοπία σάρωσης ηλεκτρονίων)
Sinθ	Sine θ (ημίτονο θ)
SPM	Scanning Probe Microscopy (μικροσκοπία ανιχνευτή σάρωσης)
TGA	Thermogravimetric Analysis (θερμοβαρυμετρική ανάλυση)
TRS	Transmission Raman Spectroscopy (φασματοσκοπία Raman διαπερατότητας)
UV	Ultra Violet radiation (υπεριώδης ακτινοβολία)
Vis	Visual (ορατό)
XRD	X-ray Diffraction (περίθλαση ακτίνων X)
XRPD	X-Ray Powder Diffraction (περίθλαση ακτίνων X κόνεως)

## 1. Φάρμακα και δραστικές ουσίες

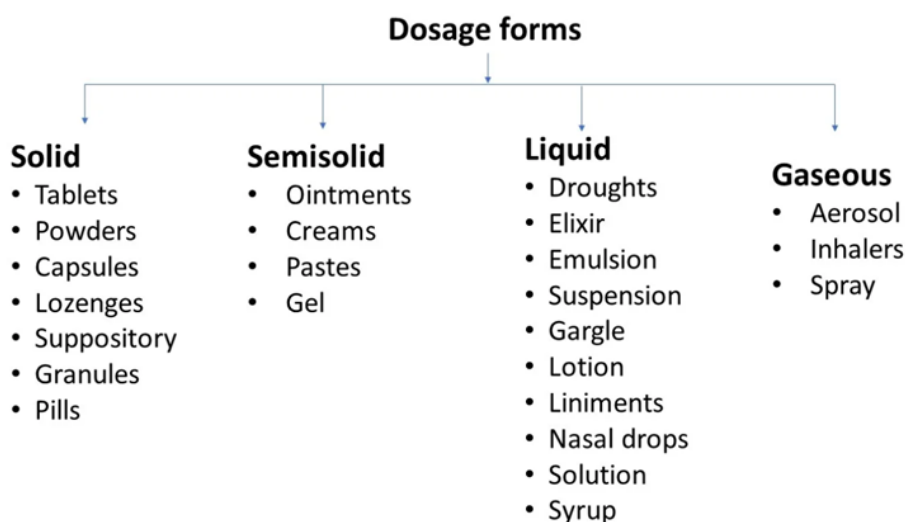
Ο όρος φάρμακο χρησιμοποιείται για να περιγράψει μια ουσία ή ένα μίγμα ουσιών που προκαλεί φυσιολογικό αποτέλεσμα όταν εισάγεται στον ανθρώπινο οργανισμό. Το κύριο συστατικό ενός φαρμάκου, το οποίο μπορεί να είναι χημικής, βιολογικής ή άλλης προελεύσεως και είναι υπεύθυνο για τη θεραπευτική του δράση, αποκαλείται φαρμακευτική δραστική ουσία (active pharmaceutical ingredient, API). Πέραν της δραστικής ουσίας ένα φάρμακο αποτελείται επιπλέον από αδρανείς χημικές ουσίες, γνωστές ως έκδοχα (excipients), που προστίθενται με σκοπό να συντελέσουν στη σταθερότητα του σκευάσματος καθώς και στη βελτίωση της μεταφοράς, της διάλυσης, της απορρόφησης, της κατανομής και της δράσης της API στον οργανισμό. Επιπλέον, τα έκδοχα χρησιμοποιούνται για την ενίσχυση ορισμένων χαρακτηριστικών του φαρμακευτικού προϊόντος, όπως είναι το χρώμα, η όψη, η οσμή, η γεύση κ.λπ. [1-8]

Τα φάρμακα χημικής προελεύσεως διακρίνονται σε δύο κύριες κατηγορίες, τα πρωτότυπα (brand name) και τα γενόσημα (generic). Τα πρωτότυπα φάρμακα συνιστούν νέα θεραπευτικά σκευάσματα, τα οποία αναπτύσσονται υπό την προστασία των διπλωμάτων ευρεσιτεχνίας ή αλλιώς πατεντών (patents). Το δίπλωμα ευρεσιτεχνίας προστατεύει την επένδυση που πραγματοποιείται για την έρευνα και την ανάπτυξη ενός φαρμάκου, παρέχοντας στην εταιρεία παρασκευής του το αποκλειστικό δικαίωμα εμπορίας του φαρμάκου αυτού για όσο διάστημα παραμένει σε ισχύ. Μετά τη λήξη της πατέντας ή άλλων συναφών αποκλειστικών δικαιωμάτων μπορεί να δοθεί το δικαίωμα παραγωγής και διάθεσης ενός παρομοίου φαρμάκου σε άλλους παρασκευαστές. [9]

Ως γενόσημα φάρμακα (generic drugs) περιγράφονται τα φάρμακα που διαθέτουν τις ίδιες δραστικές ουσίες (APIs) στην ίδια περιεκτικότητα και δοσολογία, χρησιμοποιώντας όμοιο τρόπο χορήγησης και προσφέροντας την ίδια ποιότητα, ασφάλεια, αποτελεσματικότητα καθώς και τις ίδιες θεραπευτικές επιδόσεις και ενδείξεις με εκείνες του πρωτότυπου φαρμάκου. Τα γενόσημα φάρμακα μπορούν να παρασκευαστούν και να πωληθούν από άλλους παραγωγούς, διαφορετικούς από την καινοτόμο εταιρεία, μετά τη λήξη του διπλώματος ευρεσιτεχνίας. [10-12]

## 1.1 Μορφές φαρμακευτικών δραστικών ουσιών

Τα φαρμακευτικά προϊόντα μπορούν να υφίσταται τόσο σε στερεή (solid) όσο σε ημιστερεή (semisolid), υγρή (liquid) και αέρια (gaseous) μορφή, όπως ενδεικτικά είναι τα χάπια, οι κρέμες, τα ενέσιμα διαλύματα και τα εισπνεόμενα αντίστοιχα. Οι κατηγορίες αυτές καθώς και παραδείγματα φαρμακευτικών σκευασμάτων παρατίθενται στην Εικόνα 1. Πολλές φαρμακευτικές δραστικές ουσίες χορηγούνται στον ασθενή σε στερεή κατάσταση με τη μορφή δισκίων, καψουλών, σκόνης κ.λπ. Στην κατάσταση αυτή, οι φαρμακευτικές δραστικές ουσίες μπορούν να εμφανίζονται σε διάφορες στερεές μορφές, κάθε μία με ξεχωριστές φυσικοχημικές, μηχανικές και θερμικές ιδιότητες. Αυτές οι ιδιότητες μπορούν να επηρεάσουν σημαντικά τη βιοδιαθεσιμότητα, τη σταθερότητα, τη διαλυτότητα και άλλα χαρακτηριστικά του φαρμάκου. Έτσι, η κατανόηση της σχέσης μεταξύ μιας συγκεκριμένης στερεής μορφής μιας API και της λειτουργικότητάς της είναι ιδιαίτερα σημαντική για την επιλογή της καταλληλότερης μορφής της, με στόχο τη δημιουργία ενός αποδοτικού φαρμακευτικού προϊόντος. [13-16]



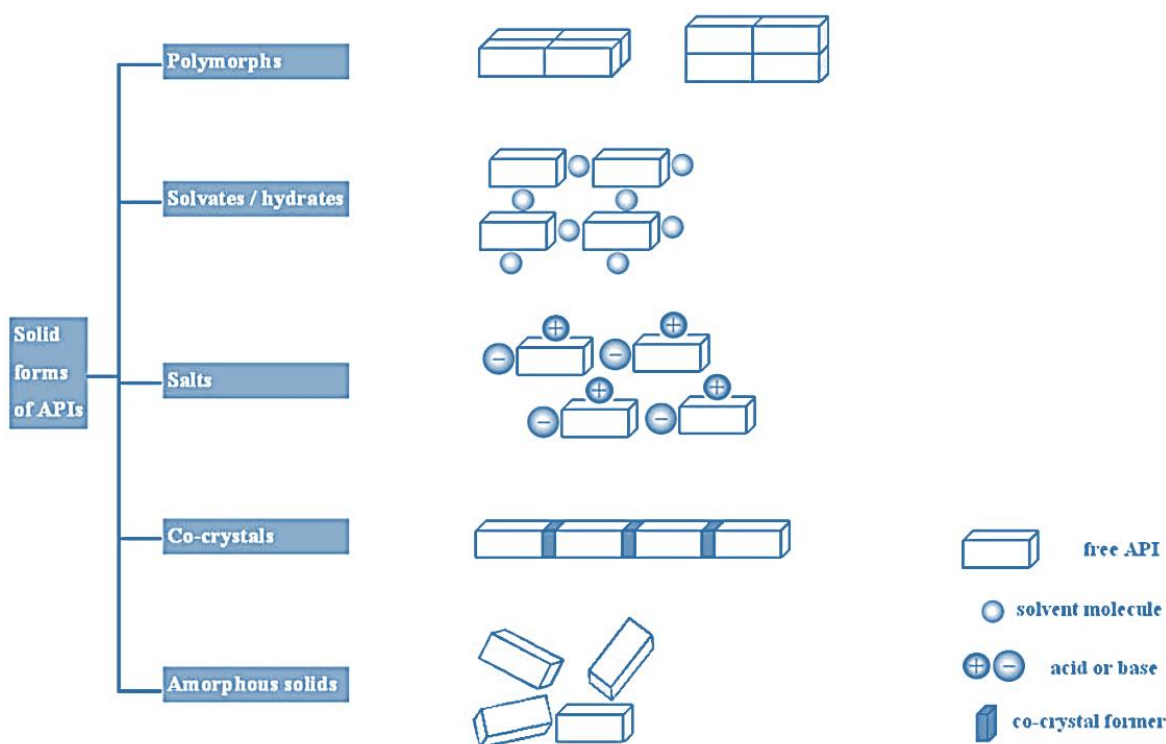
**Εικόνα 1: Μορφές φαρμακευτικών προϊόντων και παραδείγματα φαρμακευτικών σκευασμάτων που ανήκουν σε κάθε κατηγορία. [16]**

Οι στερεές μορφές στις οποίες δύναται να υπάρχει μία φαρμακευτική δραστική ουσία είναι:

- Κρυσταλλικές μορφές - πολύμορφα (Polymorphs)
- Ψευδοπολύμορφα (Pseudopolymorphs - Solvates / Hydrates)
- Άλατα (Salts)
- Συν-κρυσταλλικές μορφές (Co-crystals)
- Άμορφα στερεά (Amorphous solids)



Πιο αναλυτικά, στις κρυσταλλικές μορφές τα άτομα ή μόρια της ουσίας έχουν συγκεκριμένες διατάξεις στον χώρο, οι οποίες συνθέτουν το κρυσταλλικό πλέγμα. Τα ψευδοπολύμορφα συνιστούν κρυσταλλικές μορφές, στη δομή των οποίων περιλαμβάνονται αυστηρώς μόρια διαλύτη (solvent) σε στοιχειομετρική ή μη αναλογία. Ειδικότερα, στα ψευδοπολύμορφα ανήκουν οι επιδιαλυτομένες μορφές (solvates), οι οποίες ονομάζονται και hydrates όταν ο διαλύτης είναι το νερό. Τα άλατα είναι στερεές ουσίες, που περιέχουν ιόντα και προκύπτουν από την αντίδραση ενός οξέος (acid) με μία βάση (base). Οι συν-κρυσταλλικές μορφές αποτελούνται από δύο ή περισσότερες ενώσεις, οι οποίες παραμένουν σε στερεή κατάσταση σε θερμοκρασία δωματίου, χωρίς μεταφορά πρωτονίων, σε αντίθεση με τα άλατα. Τέλος, τα άμορφα στερεά στερούνται κρυσταλλικού πλέγματος και χαρακτηρίζονται από άτακτη διάταξη των ατόμων ή μορίων τους. Στην Εικόνα 2 δίνεται μια σχηματική αναπαράσταση των πέντε προαναφερθέντων κατηγοριών των στερεών μορφών των APIs. [17-24]

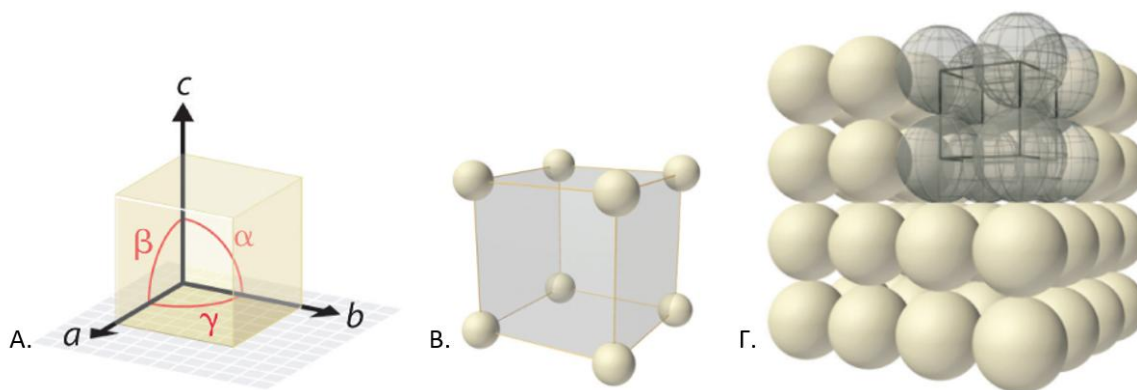


Εικόνα 2: Σχηματική αναπαράσταση των στερεών μορφών των φαρμακευτικών δραστικών ουσιών. [14]

### 1.1.1 Κρυσταλλικά συστήματα φαρμακευτικών δραστικών ουσιών

Όπως προαναφέρθηκε, στις κρυσταλλικές ουσίες τα άτομα ή μόρια διατάσσονται με συγκεκριμένο τρόπο στον χώρο, σχηματίζοντας το κρυσταλλικό πλέγμα. Συγκεκριμένα, ο όρος κρυσταλλικό πλέγμα αναφέρεται στη γεωμετρική διάρθρωση μιας χημικής ουσίας και αποτελεί χαρακτηριστικό γνώρισμα εκείνου που ονομάζεται κρύσταλλος. [25]

Πιο αναλυτικά, κάθε κρύσταλλος ή πιο συγκεκριμένα, κάθε κρυσταλλικό πλέγμα συνίσταται από μια επαναλαμβανόμενη τρισδιάστατη διάταξη καθορισμένων ατόμων / μορίων, η οποία ονομάζεται μοναδιαία κυψελίδα (unit cell). Η μοναδιαία κυψελίδα, αναπαράσταση της οποίας παρουσιάζεται στην Εικόνα 3, αποτελεί τη θεμελιώδη μονάδα από την οποία μπορεί να κατασκευαστεί ολόκληρος ο κρύσταλλος και χαρακτηρίζεται από ορισμένες παραμέτρους, όπως είναι τα στοιχεία συμμετρίας της, οι πλευρές της ( $a$ ,  $b$ ,  $c$ ) και οι γωνίες τις ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ). [26-29]



Εικόνα 3: Μοναδιαία κυψελίδα κρυστάλλου (unit cell). Α. Πλευρές ( $a, b, c$ ) και γωνίες ( $\alpha, \beta, \gamma$ ) της μοναδιαίας κυψελίδας, Β. Παράδειγμα τοποθέτησης ατόμων στη μοναδιαία κυψελίδα, Γ. Μοναδιαία κυψελίδα εντός του κρυσταλλικού πλέγματος. [28]

### Κρυσταλλικά συστήματα και κρυσταλλικές τάξεις

Σημαντικό ρόλο στη μορφολογία της μοναδιαίας κυψελίδας και κατ' επέκταση του κρυστάλλου κατέχουν τα στοιχεία συμμετρίας, όπως είναι οι άξονες, τα επίπεδα, τα κέντρα συμμετρίας κ.ά. Κοινά στοιχεία συμμετρίας καθορίζουν μία κρυσταλλική τάξη (crystal class), ενώ μια ομάδα κρυσταλλικών τάξεων προσδιορίζει ένα κρυσταλλικό σύστημα (crystal structure). [26,28]

Με βάση τα παραπάνω, ορίζονται 32 κρυσταλλικές τάξεις και επτά βασικά κρυσταλλικά συστήματα, δηλαδή γεωμετρικές δομήσεις κρυστάλλων. Τα 7 βασικά κρυσταλλικά συστήματα είναι:

- Κυβικό (Cubic), όπου όλες οι πλευρές είναι ίσες και όλες οι γωνίες είναι ίσες με  $90^\circ$ .
- Τετραγωνικό (Tetragonal), όπου δύο πλευρές είναι ίσες και όλες οι γωνίες είναι ίσες με  $90^\circ$ .
- Ορθορομβικό (Orthorhombic), στο οποίο όλες οι πλευρές είναι άνισες όμως όλες οι γωνίες είναι ίσες με  $90^\circ$ .
- Μονοκλινές (Monoclinic), όπου όλες οι πλευρές είναι άνισες και δύο από τις τρεις γωνίες είναι ίσες με  $90^\circ$ .
- Εξαγωνικό (Hexagonal), το οποίο διαθέτει 2 ίσες πλευρές, δύο γωνίες ίσες με  $90^\circ$  και μία αμβλεία γωνία ίση με  $120^\circ$ .
- Ρομβοεδρικό (Rhombohedral), αναφέρεται και ως Τριγωνικό (Trigonal), όπου όλες οι πλευρές είναι ίσες και όλες οι γωνίες είναι ίσες αλλά διάφορες των  $90^\circ$ .
- Τρικλινές (Triclinic), στο οποίο όλες οι πλευρές είναι άνισες και όλες οι γωνίες είναι άνισες μεταξύ τους και διάφορες των  $90^\circ$ . [30]

Οι 32 κρυσταλλικές τάξεις ταξινομημένες με βάση τα 7 κρυσταλλικά συστήματα που προαναφέρθηκαν παρουσιάζονται στον Πίνακα 1.

Κρυσταλλικό Σύστημα	Κρυσταλλικές Τάξεις						
Κυβικό	23	m3	432	$\bar{4}3m$	m3m		
Τετραγωνικό	4	$\bar{4}$	4/m	422	4mm	$\bar{4}2m$	4/mmm
Ορθορομβικό	222	mm2	mmm				
Μονοκλινές	2	m	2/m				
Εξαγωνικό	6	$\bar{6}$	6/m	622	6mm	$\bar{6}m2$	6/mmm
Ρομβοεδρικό	3	$\bar{3}$	32	3m	$\bar{3}m$		
Τρικλινές	1	$\bar{1}$					

Πίνακας 1: Κρυσταλλικές τάξεις σύμφωνα με τα κρυσταλλικά συστήματα στα οποία ανήκουν. [27]

### Άξονας περιστροφικής συμμετρίας

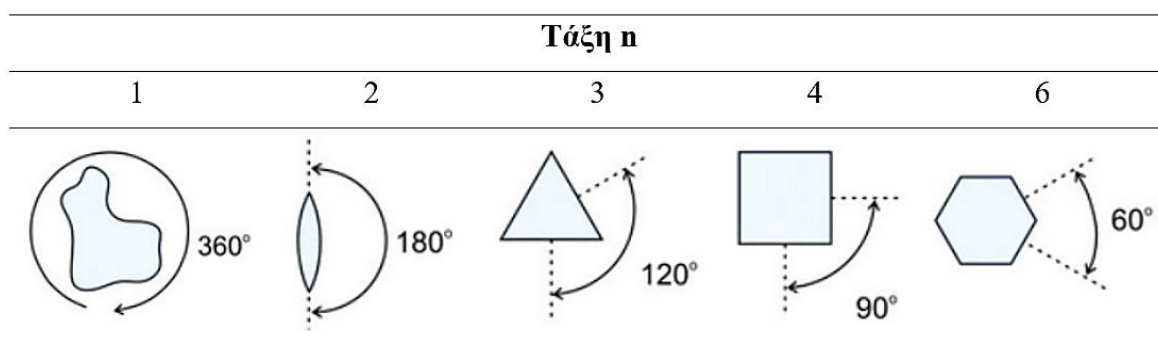
Μεταξύ των στοιχείων συμμετρίας που καθορίζουν τις κρυσταλλικές τάξεις και τα κρυσταλλικά συστήματα, βασικό ρόλο κατέχει ο άξονας περιστροφικής συμμετρίας. Στον

Πίνακα 2 παρατίθενται οι χαρακτηριστικοί άξονες περιστροφικής συμμετρίας που πρέπει να διαθέτει μία μοναδιαία κυψελίδα ώστε να ανήκει σε ένα από τα παραπάνω 7 κρυσταλλικά συστήματα. Ως άξονας περιστροφικής συμμετρίας τάξης  $n$ , χαρακτηρίζεται ο άξονας γύρω από τον οποίο ένας κρύσταλλος περιστρέφεται κατά  $360^\circ/n$  και συμβολίζεται ως  $C_n$ . Έτσι, ο άξονας συμμετρίας  $C_2$  υποδηλώνει ότι ο κρύσταλλος μπορεί να πραγματοποιήσει μία περιστροφή κατά  $180^\circ$  γύρω από εκείνον, ενώ ένας άξονας  $C_3$  πως ο κρύσταλλος δύναται να πραγματοποιήσει περιστροφή κατά  $120^\circ$ . Με την ίδια λογική, ένας άξονας  $C_4$  σχετίζεται με τη περιστροφική κίνηση ενός κρυστάλλου κατά  $90^\circ$  και ο άξονας  $C_6$  με την περιστροφή κατά  $60^\circ$ . [27]

Κρυσταλλικό Σύστημα	Χαρακτηριστικά Στοιχεία Συμμετρίας
Τρικλινές	Καμία (Ένας άξονας $C_1$ )
Μονοκλινές	Ένας άξονας $C_2$
Ορθορομβικό	Τρεις ορθογώνιοι άξονες $C_2$
Ρομβοεδρικό	Ένας άξονας $C_3$
Τετραγωνικό	Ένας άξονας $C_4$
Εξαγωνικό	Ένας άξονας $C_6$
Κυβικό	Τέσσερις άξονες $C_3$ σε τετραεδρική διάταξη

**Πίνακας 2:** Τα χαρακτηριστικά στοιχεία περιστροφικής συμμετρίας που ορίζουν τα 7 κρυσταλλικά συστήματα. [27]

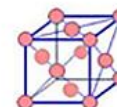
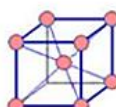
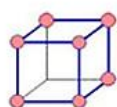
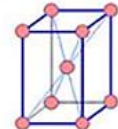
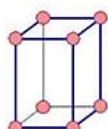
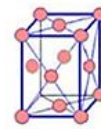
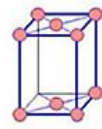
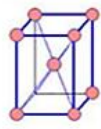
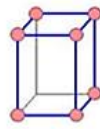
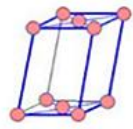
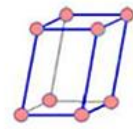
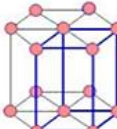
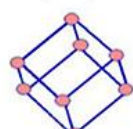
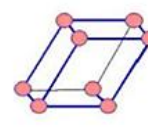
Στην Εικόνα 4 που ακολουθεί, δίνεται μία σχηματική απεικόνιση των αξόνων περιστροφικής συμμετρίας, ανάλογα με την τάξη  $n$ , χρησιμοποιώντας δισδιάστατα παραδείγματα. Όπως παρατηρούμε ένας κρύσταλλος που δεν παρουσιάζει κάποια συμμετρία, έχει έναν άξονα  $C_1$ .



**Εικόνα 4:** Δισδιάστατα παραδείγματα των αξόνων περιστροφικής συμμετρίας ( $C_1$ - $C_6$ ). [31]

## Πλέγματα Bravais

Τα 7 κρυσταλλικά συστήματα μπορούν να αναλυθούν σε 14 συνυπολογίζοντας τις υποκατηγορίες τους, οι οποίες προκύπτουν από την τοποθέτηση των ατόμων ή μορίων εντός της μοναδιαίας κυψελίδας. Η τοποθέτηση αυτή μπορεί να συμβαίνει είτε στο κέντρο της κυψελίδας, είτε στις εξωτερικές επιφάνειές της, είτε αποκλειστικά στις βάσεις της. Τα 14 αυτά κρυσταλλικά συστήματα ονομάζονται πλέγματα Bravais και παρουσιάζονται σχηματικά στην Εικόνα 5. [27,30]

<div>1. Cubic</div> <div><math>a = b = c, \alpha = \beta = \gamma = 90^\circ</math></div> <div></div> <div>Simple      Body-centered      Face-centered</div>	<div>2. Tetragonal</div> <div><math>a = b \neq c, \alpha = \beta = \gamma = 90^\circ</math></div> <div></div> <div>Simple      Body-centered</div>	
<div>3. Orthorhombic</div> <div><math>a \neq b \neq c, \alpha = \beta = \gamma = 90^\circ</math></div> <div></div> <div>Simple    Body-centered    Base-centered    Face-centered</div>	<div>4. Monoclinic</div> <div><math>a \neq b \neq c, \alpha = \gamma = 90^\circ \neq \beta</math></div> <div></div> <div>Simple      Base-centered</div>	
<div>5. Hexagonal</div> <div><math>a = b \neq c,</math> <math>\alpha = \beta = 90^\circ, \gamma = 120^\circ</math></div> <div></div>	<div>6. Rhombohedral</div> <div><math>a = b = c,</math> <math>\alpha = \beta = \gamma \neq 90^\circ</math></div> <div></div>	<div>7. Triclinic</div> <div><math>a \neq b \neq c,</math> <math>\alpha \neq \beta \neq \gamma \neq 90^\circ</math></div> <div></div>

Εικόνα 5: Κρυσταλλικά πλέγματα κατά Bravais. Τα σημεία που απεικονίζονται είναι πλεγματικά σημεία και δεν είναι απαραίτητα κατειλημμένα από άτομα. [27,30]

Πιο αναλυτικά, όταν μια μοναδιαία κυψελίδα διαθέτει πλεγματικά σημεία μόνο στις κορυφές της χαρακτηρίζεται ως πρωτογενής (simple) και συμβολίζεται με το γράμμα P. Εάν υπάρχει ένα επιπλέον πλεγματικό σημείο στο κέντρο της ονομάζεται χωροκεντρωμένη (body-centered) και συμβολίζεται με I. Όταν τα πλεγματικά σημεία βρίσκονται τόσο στις

κορυφές όσο και στα κέντρα των έξι εδρών μιας κυψελίδας, τότε αυτή χαρακτηρίζεται ως ενδοκεντρωμένη (face-centered) και συμβολίζεται με το γράμμα F. Τέλος, όταν μια μοναδιαία κυψελίδα έχει πλεγματικά σημεία στις κορυφές της και στα κέντρα δύο απέναντι εδρών της ονομάζεται βασικεντρωμένη (base-centered) και συμβολίζεται με το γράμμα C. [27]

Σύμφωνα λοιπόν με τα παραπάνω, τα επτά κρυσταλλικά συστήματα σε συνδυασμό με τα πλέγματα Bravais και τα χαρακτηριστικά τους συνοψίζονται στον παρακάτω Πίνακα 3.

Κρυσταλλικό Σύστημα	Χαρακτηριστικά γωνιών και πλευρών κυψελίδας	Πλέγμα Bravais (δομή κυψελίδας)	Συμβολισμός πλέγματος
Κυβικό	$a = b = c$ $\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$	Πρωτογενής	P
		Χωροκεντρωμένη	I
		Ενδοκεντρωμένη	F
Τετραγωνικό	$a = b \neq c$ $\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$	Πρωτογενής	P
		Χωροκεντρωμένη	I
Ορθορομβικό	$a \neq b \neq c$ $\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$	Πρωτογενής	P
		Χωροκεντρωμένη	I
		Βασικεντρωμένη	C
		Ενδοκεντρωμένη	F
Μονοκλινές	$a \neq b \neq c$ $\alpha = \gamma = 90^\circ \neq \beta$	Πρωτογενής	P
		Βασικεντρωμένη	C
Εξαγωνικό	$a = b \neq c$ $\alpha = \beta = 90^\circ, \gamma = 120^\circ$	Πρωτογενής	P
Ρομβοεδρικό (Τριγωνικό)	$a = b = c$ $\alpha = \beta = \gamma \neq 90^\circ$	Πρωτογενής	R
Τρικλινές	$a \neq b \neq c$ $\alpha \neq \beta \neq \gamma \neq 90^\circ$	Πρωτογενής	P

Πίνακας 3: Τα 7 κρυσταλλικά συστήματα και τα πλέγματα κατά Bravais. [27,30]

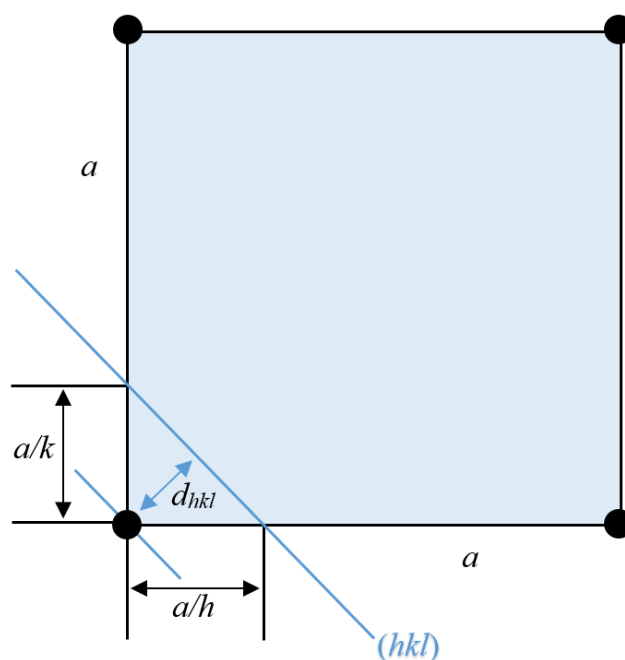
### Κρυσταλλικά επίπεδα

Με τον όρο κρυσταλλικό ή αλλιώς πλεγματικό επίπεδο (Crystal/Lattice plane) ορίζεται η νοητή επιφάνεια που διέρχεται μέσα από το κρυσταλλικό πλέγμα και τέμνει τα πλεγματικά

του σημεία. Η απόσταση μεταξύ των επιπέδων των πλεγματικών σημείων, δηλαδή των σημείων εκείνων όπου το επίπεδο τέμνει τα πλεγματικά σημεία ενός κρυσταλλικού συστήματος, αποτελεί σημαντική παράμετρο της δομής ενός κρυστάλλου. Για το λόγο αυτό, έχουν οριστεί οι δείκτες Miller για τον χαρακτηρισμό των πλεγματικών επιπέδων ενός κρυστάλλου. [27,32]

Οι δείκτες Miller ( $hkl$ ) αποτελούν μια συμβολική διανυσματική αναπαράσταση για τον προσανατολισμό ενός κρυσταλλικού επιπέδου σε ένα κρυσταλλικό πλέγμα και ορίζονται ως οι αντίστροφοι των αποστάσεων των τομών εκείνων που δημιουργούν τα επίπεδα σε συνδυασμό με τα πλεγματικά σημεία. Ουσιαστικά πρόκειται για ένα σύστημα τριών αριθμών-σημείων, που χρησιμοποιούνται για να ορίσουν ένα επίπεδο, με βάση τους τρεις άξονες  $x$ ,  $y$  και  $z$ . [27,32]

Στην Εικόνα 6 παρουσιάζονται οι διαστάσεις μιας μοναδιαίας κυψελίδας και η σχέση τους με το επίπεδο που διέρχεται από τα πλεγματικά του σημεία.

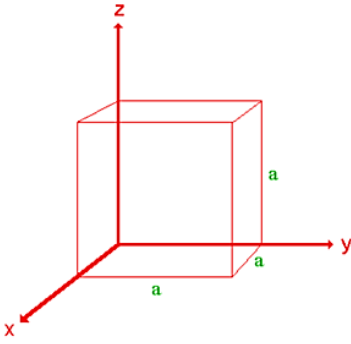
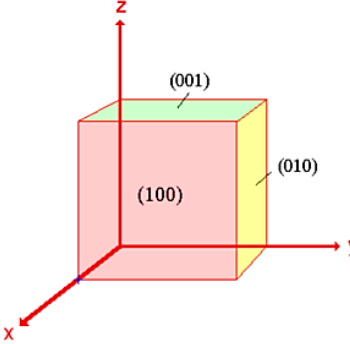
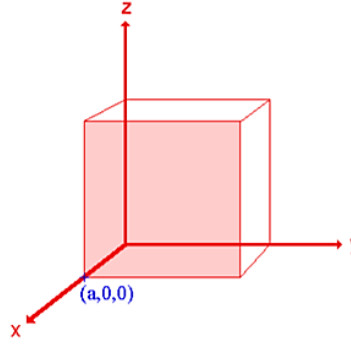
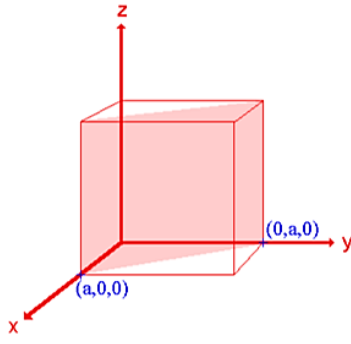
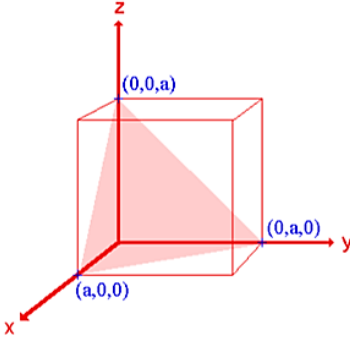
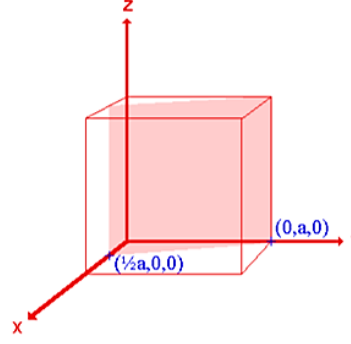


Εικόνα 6: Δείκτες Miller ( $hkl$ ): Διαστάσεις μοναδιαίας κυψελίδας και η σχέση τους με τα πλεγματικά σημεία από όπου διέρχεται ένα επίπεδο. [27]

Στην Εικόνα 7 παρουσιάζονται μερικά παραδείγματα δεικτών Miller σε ένα κυβικό κρυσταλλικό σύστημα. Ο μηδενισμός ενός από τους τρεις αριθμούς (δείκτες) υποδεικνύει πως το επίπεδο είναι παράλληλο στον αντίστοιχο άξονα. Έτσι, μηδενισμός του δείκτη  $h$



υποδηλώνει πως το επίπεδο είναι παράλληλο στον άξονα  $x$  ( πλευρά  $a$  της μοναδιαίας κυψελίδας), του δείκτη  $k$  πως το επίπεδο είναι παράλληλο στον άξονα  $y$  ( πλευρά  $b$  της κυψελίδας) και του δείκτη  $l$  παράλληλο προς τον άξονα  $z$  ( πλευρά  $c$  της κυψελίδας). [27]

Κυβικό Σύστημα	Κρυσταλλικά Επίπεδα	(100)
		
(110)	(111)	(210)
		

Εικόνα 7: Δείκτες Miller ( $hkl$ ) πλεγματικών σημείων κυβικού κρυσταλλικού συστήματος. [32]

Να σημειωθεί πως ο συμβολισμός ( $hkl$ ) αναφέρεται σε ένα μεμονωμένο επίπεδο. Για να καθοριστεί ένα σύνολο (σμήνος) παράλληλων επιπέδων χρησιμοποιείται ο συμβολισμός  $\{hkl\}$ . [27]

## 1.2 Πολυμορφισμός φαρμακευτικών δραστικών ουσιών

Η ικανότητα ορισμένων ουσιών να απαντώνται σε περισσότερες από μία κρυσταλλικές μορφές στη στερεή κατάσταση ονομάζεται πολυμορφισμός. Οι κρυσταλλικές αυτές μορφές της ίδιας ουσίας παρουσιάζουν μεταξύ τους διαφορετική διάταξη ή / και διαμόρφωση των

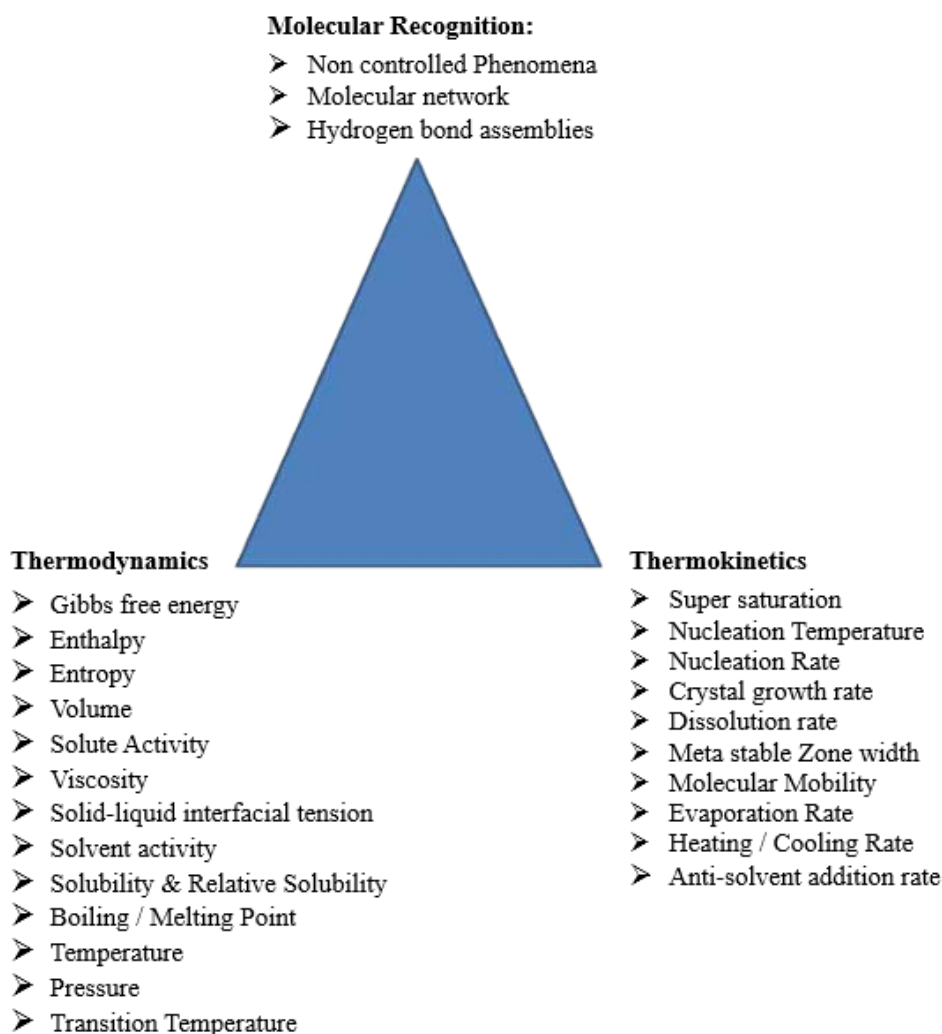


ατόμων ή μορίων τους στο κρυσταλλικό πλέγμα. Με απλούστερα λόγια τα πολύμορφα, ή αλλιώς πολυμορφισμοί όπως αποκαλούνται, έχουν την ίδια χημική σύνθεση αλλά παρουσιάζουν διαφορετική δομή πλέγματος ή / και διαφορετικές μοριακές διαμορφώσεις. Η διαφοροποίηση αυτή στη δομή της ουσίας επιφέρει ποικιλία στις φυσικοχημικές ιδιότητες, όπως η χημική σταθερότητα, η διαλυτότητα, η πυκνότητα, η σκληρότητα, το σημείο τήξης, η υγροσκοπικότητα, η αλληλεπίδραση με τα βιολογικά συστήματα κ.ά. Στον Πίνακα 4 παρατίθενται οι φυσικοχημικές και φαρμακευτικές ιδιότητες των APIs που διαφέρουν μεταξύ των διαφορετικών πολυμόρφων μίας ουσίας. [17,18,20,33-37]

<b>Φυσικοχημικές και φαρμακευτικές ιδιότητες πολυμορφισμών των APIs</b>	
Συνήθης κρυσταλλική μορφή (Crystal habit)	Μορφολογία (Morphology)
Ενθαλπία (Enthalpy)	Σταθερότητα (Stability)
Εγγενής διαλυτότητα (Intrinsic solubility)	Ρυθμός διάλυσης (Dissolution rate)
Δείκτης διάθλασης / Οπτικές ιδιότητες (Refractive index / Optical properties)	Υγροσκοπικότητα (Hygroscopy)
Φασματικές δονητικές μεταβάσεις (Spectral vibrational transitions)	Συμβατότητα (Compatibility)
Μοριακός όγκος και πυκνότητα (Molar volume and density)	Διαχείριση (Handling)
Ικανότητα ταμπλετοποίησης (Tabletability)	Σκληρότητα (Hardness)
Βιοδιαθεσιμότητα (Bioavailability)	Αναμιξιμότητα (Blending)
Ρευστότητα (Flowability)	Σημείο τήξης (Melting point)

**Πίνακας 4: Φυσικοχημικές και φαρμακευτικές ιδιότητες των APIs που διαφέρουν μεταξύ των διαφόρων πολυμορφισμών μίας ουσίας. [37]**

Για τις ουσίες που παρουσιάζουν πολυμορφισμό, η μετατροπή από τη μία κρυσταλλική μορφή (πολύμορφο) στην άλλη είναι ένα σύνηθες φαινόμενο. Έτσι, η γνώση της θερμοκινητικής αλλά και της θερμοδυναμικής σταθερότητας είναι απαραίτητη για την καλύτερη κατανόηση των μετατροπών μεταξύ των πολυμόρφων καθώς και του χρόνου που απαιτείται για να πραγματοποιηθούν οι μετατροπές αυτές. Η Εικόνα 8 απεικονίζει την επίδραση διαφόρων θερμοκινητικών και θερμοδυναμικών παραμέτρων στις μοριακές ιδιότητες που οδηγούν σε πολυμορφικές μεταβάσεις. [24,37]



**Εικόνα 8:** Αναπαράσταση της σχέσης μεταξύ των θερμοδυναμικών και θερμοκινητικών παραμέτρων στις μετατροπές στερεών καταστάσεων. [24]

Η θερμοδυναμική σταθερότητα, αποτελεί έναν ιδιαίτερα σημαντικό παράγοντα τόσο κατά το σχεδιασμό της δραστικής ουσίας ενός φαρμάκου, όσο και της τελικής του μορφής (final dosage form). Σύμφωνα με τις αρχές της θερμοδυναμικής, ένα μόνο πολύμορφο μιας ουσίας μπορεί να θεωρηθεί ως σταθερή μορφή (thermodynamically stable form) υπό συγκεκριμένες συνθήκες, χαρακτηριζόμενη από τη χαμηλότερη ελεύθερη ενέργεια. Οι υπόλοιπες μορφές αναφέρονται ως μετασταθείς πολυμορφισμοί (metastable forms). [38-41]

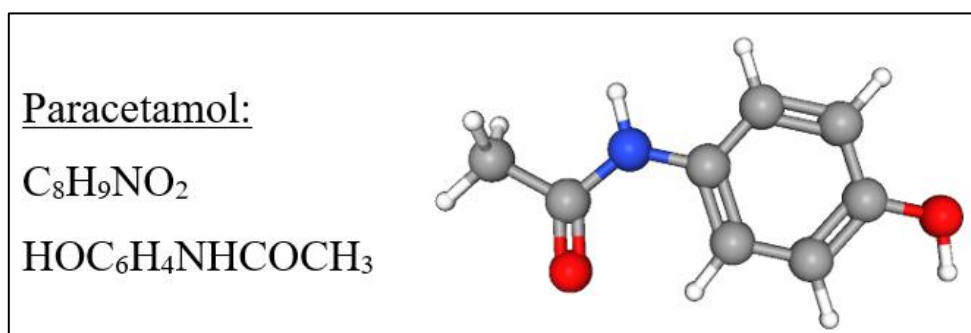
Πιο αναλυτικά, η σχετική σταθερότητα και η κινητήρια δύναμη για τις πολυμορφικές μετατροπές υπό σταθερή θερμοκρασία και πίεση καθορίζονται από την ελεύθερη ενέργεια Gibbs ( $\Delta G$ ), δηλαδή την εσωτερική ενέργεια που είναι διαθέσιμη για παραγωγή χημικού έργου, όπως παρουσιάζεται στην εξίσωση (1):

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S \quad (1)$$

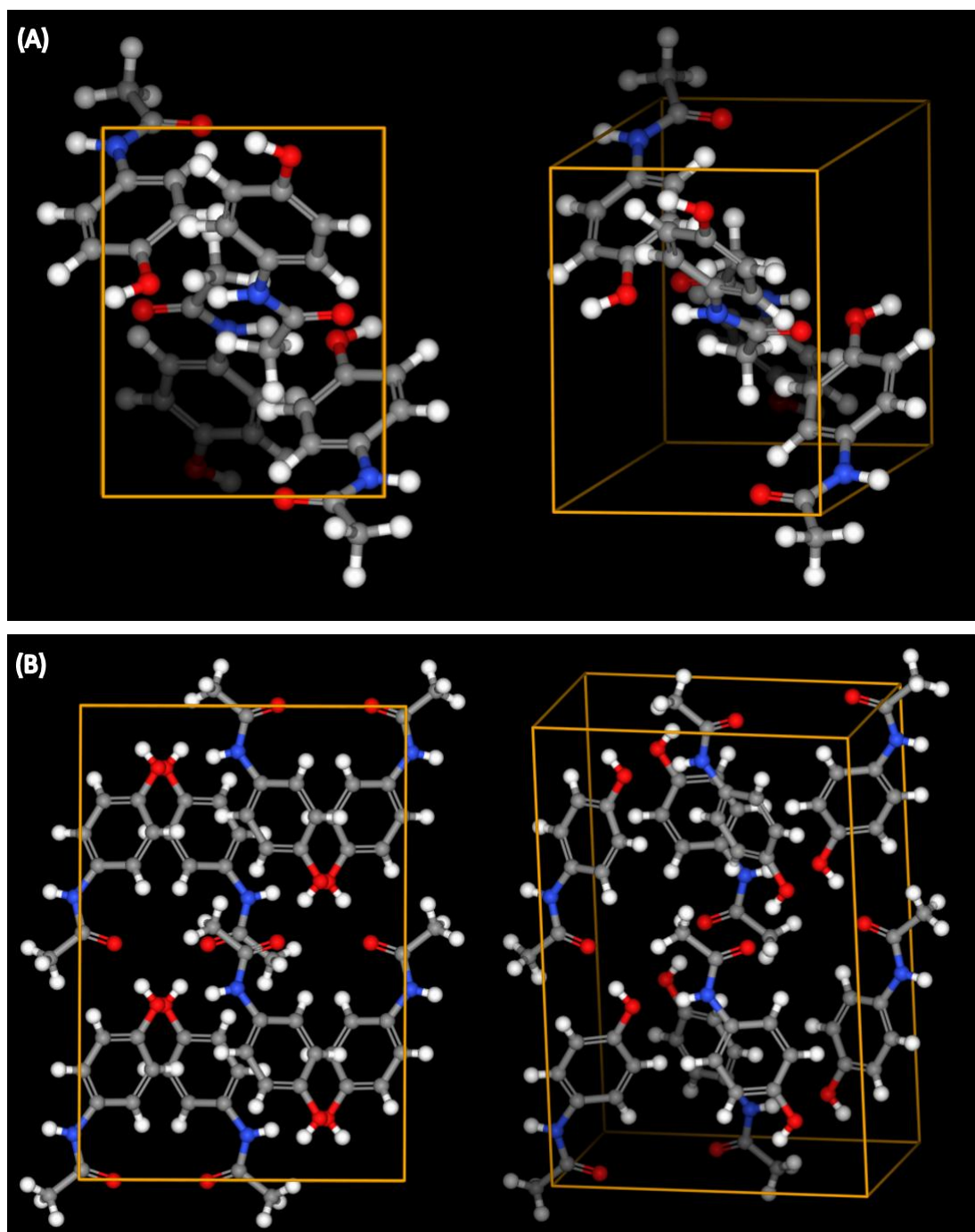
Όπου ο παράγοντας  $\Delta H$  αντιπροσωπεύει τη μεταβολή της ενθαλπίας, ενώ ο παράγοντας  $\Delta S$  αναφέρεται στη μεταβολή της εντροπίας. Αρνητική τιμή του  $\Delta G$  διασφαλίζει την αυθόρμητη φύση των πολυμορφικών μετατροπών, ενώ θετική τιμή καθιστά τη διαδικασία μη αυθόρμητη. [24]

Ο πολυμορφισμός συνιστά ένα φαινόμενο που παρατηρείται σε περισσότερες από τις μισές φαρμακευτικές δραστικές ουσίες. Η ευρεία αυτή εμφάνιση του πολυμορφισμού στις API μας επιτρέπει την παράθεση πλήθους παραδειγμάτων χημικών ενώσεων που παρουσιάζουν πολύμορφα. Μία από τις πλέον διαδεδομένες φαρμακευτικές δραστικές ουσίες που μπορεί να αποτελέσει παράδειγμα είναι η Παρακεταμόλη, ή αλλιώς Ακεταμινοφαίνη, μια ουσία που συναντάται σε πολυάριθμα αναλγητικά φαρμακευτικά σκευάσματα, καθώς αποτελεί έναν ασθενή αναστολέα των προσταγλαδινών του κεντρικού νευρικού συστήματος (ΚΝΣ). Η Παρακεταμόλη δύναται να κρυσταλλώνεται σε τρεις διαφορετικές μορφές, τη σταθερή μονοκλινή μορφή I (FI), τη μετασταθή ορθορομβική μορφή II (FII) και τη μορφή III (FIII), η οποία είναι ιδιαιτέρως ασταθής και η δομή της δεν έχει πλήρως αποσαφηνιστεί. Ο εν λόγω πολυμορφισμός της Παρακεταμόλης παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον για την ανάπτυξη φαρμακευτικών προϊόντων καθώς η μορφή I, η οποία κυριαρχεί εμπορικά, χαρακτηρίζεται από θερμοδυναμική σταθερότητα υπό συνθήκες περιβάλλοντος. Αντίθετα, η μορφή II διαθέτει υψηλότερη πυκνότητα, γεγονός που την καθιστά σταθερότερη υπό συνθήκες αυξημένης πίεσης και πιο διαλυτή. [13,41,43-51]

Στην Εικόνα 9 παρουσιάζεται ο χημικός τύπος καθώς και η δομή του μορίου της Παρακεταμόλης, ενώ στην Εικόνα 10 παρουσιάζονται οι δομές της μοναδιαίας κυψελίδας των πολυμόρφων I και II της ουσίας.



Εικόνα 9: Χημικός τύπος και δομή του μορίου της Παρακεταμόλης. [52]



Εικόνα 10: Μοναδιαία κυψελίδα της κρυσταλλικής μορφής I (Α) και II (Β) της Παρακεταμόλης. [53-55]

Τα πολύμορφα μιας δραστικής ουσίας παρουσιάζουν διαφορετικές φυσικές και χημικές ιδιότητες, οι οποίες επηρεάζουν τη σταθερότητα και τη βιοδιαθεσιμότητα των φαρμακευτικών προϊόντων. Αυτές οι διαφορές των ιδιοτήτων μεταξύ των πολυμορφισμών μίας δραστικής ουσίας έχουν προσελκύσει έντονα το ενδιαφέρον της φαρμακευτικής βιομηχανίας, καθώς η ύπαρξή τους μπορεί να επιφέρει ουσιώδεις μεταβολές στη σύνθεση,

την επεξεργασία και τη διαθεσιμότητα των φαρμάκων. Το γεγονός αυτό δεν οδηγεί μόνο στην ανάπτυξη φαρμάκων με βελτιωμένα χαρακτηριστικά, αλλά και στην ταχεία εξέλιξη του εξαιρετικά επικερδούς για τις φαρμακοβιομηχανίες τομέα των γενοσήμων. [56-63]

## **2. Μελέτη των πολυμορφισμών δραστικών ουσιών φαρμάκων**

Τα τελευταία χρόνια, ο πολυμορφισμός των φαρμακευτικών δραστικών ουσιών έχει μελετηθεί εκτενώς και οι στρατηγικές για την ανεύρεση πολυμόρφων, καθώς και οι κατάλληλες τεχνικές χαρακτηρισμού τους έχουν βρεθεί στο επίκεντρο του ενδιαφέροντος. Στη διαδικασία ανάπτυξης φαρμάκων, η έρευνα του πολυμορφισμού αποσκοπεί στην εύρεση μιας σταθερής μορφής μιας φαρμακευτικής ουσίας, με τις επιθυμητές ιδιότητες. Στόχος αυτής της έρευνας είναι να βρεθούν όσο το δυνατόν περισσότερες τέτοιες μορφές προκειμένου να βελτιωθεί η ποιότητα των φαρμακευτικών προϊόντων αλλά και να εξασφαλιστεί η ευρεία προστασία των δικαιωμάτων πνευματικής ιδιοκτησίας σχετικά με τα φαρμακευτικά σκευάσματα. [14,64,65]

Η ανακάλυψη και ακολούθως ο χαρακτηρισμός πολυμορφισμών έχει καταστεί πλέον μια ιδιαίτερος συνηθισμένη διαδικασία για τις φαρμακευτικές εταιρείες. Ακόμη, η καθιέρωση αξιόπιστων αναλυτικών τεχνικών για την ταυτοποίηση των μεμονωμένων κρυσταλλικών μορφών αποτελεί σημαντικό ζήτημα, τόσο για την ανάπτυξη νέων βελτιωμένων φαρμάκων όσο και για την εξέλιξη των υφιστάμενων ενισχύοντας τη συνολική ποιότητα και αποτελεσματικότητά τους. [64]

Η ανάπτυξη νέων πολυμόρφων ωστόσο, δεν είναι ο μοναδικός λόγος για τον οποίο η μελέτη του πολυμορφισμού των API έχει καταστεί τόσο σημαντική. Ο έλεγχος της ύπαρξης ανεπιθύμητων πολυμόρφων μιας API εντός ενός φαρμακευτικού σκευάσματος μετά την παρασκευή του, καθώς και η μετέπειτα ανάλυση του προϊόντος για τη πιθανή μετατροπή της δραστικής ουσίας του από μία κρυσταλλική μορφή σε μία άλλη είναι εξίσου κρίσιμες διαδικασίες για τη φαρμακευτική βιομηχανία. Αυτό διότι, και στις δύο περιπτώσεις υπάρχει η πιθανότητα ιδιότητες όπως ο ρυθμός διάλυσης, η διαλυτότητα και η βιοδιαθεσιμότητα του φαρμάκου να επηρεαστούν. [66]

### **2.1 Αναλυτικές τεχνικές για τη μελέτη του πολυμορφισμού των φαρμακευτικών δραστικών ουσιών**

Όπως αναφέρεται στην επιστημονική μελέτη του Shan-Yang Lin (2014), πλήθος αναλυτικών τεχνικών δύναται να εφαρμοστούν για τον πλήρη χαρακτηρισμό των

πολυμόρφων μιας φαρμακευτικής δραστικής ουσίας. Ο Πίνακας 5 παρουσιάζει τις συχνότερα χρησιμοποιούμενες αναλυτικές τεχνικές για την ταυτοποίηση και τον χαρακτηρισμό των πολυμόρφων φαρμακευτικών ουσιών. Οι τεχνικές αυτές συμπεριλαμβάνουν την κρυσταλλογραφία (Crystallography), τη φασματοσκοπία (Spectroscopy), τη μικροσκοπία (Microscopy), τη θερμική ανάλυση (Thermal Analysis) καθώς και κάποιες ταυτόχρονες συνδυασμένες μεθόδους (Simultaneous combined methods) στοχεύοντας είτε στον προσδιορισμό της κρυσταλλικής δομής της ουσίας είτε στον ποσοτικό και ποιοτικό προσδιορισμό αυτών. [20,24,37,67-69]

Φασματοσκοπία	Κρυσταλλογραφία
Φασματομετρία υπέρυθρου (IR)	Περίθλαση ακτίνων X μονοκρυστάλλου (SCXRD)
Φασματομετρία εγγύς υπέρυθρου (NIR)	Περίθλαση ακτίνων X κόνεως (XRPD)
Φασματοσκοπία Raman	Θερμικές μέθοδοι
Φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR) στερεάς κατάστασης	Διαφορική θερμική ανάλυση (DTA)
Φασματοσκοπία Terahertz	Διαφορική θερμιδομετρία σάρωσης (DSC)
Φασματοσκοπία UV διάχυτης ανάκλασης	Θερμοβαρυμετρική ανάλυση (TGA)
Μικροσκοπία	Ισοθερμική μικροθερμιδομετρία (IMC)
Μικροσκοπία πολωμένου φωτός (PLM)	Ταυτόχρονες συνδυασμένες μέθοδοι
Μικροσκοπία θερμαινόμενου σταδίου (HSM)	DSC-FTIR μικρο-φασματοσκοπία
Μικροσκοπία σάρωσης ηλεκτρονίων (SEM)	Thermal (DSC)-Raman μικρο-φασματοσκοπία
Μικροσκοπία ατομικής δύναμης (AFM)	DSC-XRD
Μικροσκοπία ανιχνευτή σάρωσης (SPM)	DSC-NIR

**Πίνακας 5: Αναλυτικές τεχνικές που χρησιμοποιούνται συχνότερα για τον χαρακτηρισμό πολυμορφισμών φαρμακευτικών δραστικών ουσιών. [37]**

Στην παρούσα εργασία θα εξεταστούν τρεις θεμελιώδεις και ευρέως διαδεδομένες φασματομετρικές τεχνικές, οι οποίες διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην ανάλυση των πολυμορφισμών δραστικών φαρμακευτικών ουσιών: η περίθλαση ακτίνων X (XRD), η φασματομετρία υπέρυθρου (IR spectroscopy) και η φασματοσκοπία Raman (Raman spectroscopy).



### **2.1.1 Η τεχνική της Φασματοσκοπίας**

Η φασματοσκοπία αποτελεί έναν γενικό όρο, ο οποίος χρησιμοποιήθηκε αρχικά για να περιγράψει το επιστημονικό πεδίο που ασχολείται με την αλληλεπίδραση διαφόρων τύπων ακτινοβολίας με την ύλη. Πιο συγκεκριμένα, εξετάζει και ερμηνεύει την εκπομπή και την απορρόφηση ακτινοβολίας από τα σωματίδια της ύλης όπως είναι τα άτομα, τα ιόντα, κ.λπ., καθώς επίσης και την πόλωση και σκέδαση ακτινοβολίας από την ύλη. Στις μέρες μας, η έννοια της φασματοσκοπίας έχει διευρυνθεί συμπεριλαμβάνοντας πλέον και φαινόμενα που αφορούν την αλληλεπίδραση της ύλης με άλλες μορφές ενέργειας, όπως είναι οι αλληλεπιδράσεις δεσμών ιόντων ή ηλεκτρονίων και ακουστικών κυμάτων με την ύλη. [70,71]

Η φασματοσκοπία διακρίνεται σε δύο κύριες κατηγορίες: την ατομική φασματοσκοπία (Atomic Spectroscopy) και την μοριακή φασματοσκοπία (Molecular Spectroscopy). Η ατομική φασματοσκοπία περιλαμβάνει τις φασματομετρικές τεχνικές που εφαρμόζονται για την ταυτοποίηση και τον προσδιορισμό στοιχείων (ατόμων) στις διάφορες μορφές τους εντός της ύλης. Αντιθέτως, η μοριακή φασματοσκοπία αφορά τις φασματομετρικές τεχνικές που χρησιμοποιούνται για τον προσδιορισμό της δομής ολόκληρων μορίων. [70,71]

#### ***Περίθλαση Ακτίνων X (XRD)***

Η περίθλαση ακτίνων X (X-ray diffraction, XRD) είναι μία τεχνική ατομικής φασματοσκοπίας, συγκεκριμένα ατομικής φασματομετρίας ακτίνων X, η οποία βασίζεται στη μέτρηση της περίθλασης της ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας. Οι ακτίνες X αποτελούν ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία μικρού μήκους κύματος, η οποία παράγεται μέσω της επιβράδυνσης ηλεκτρονίων υψηλής ενέργειας ή κατά τη διάρκεια ηλεκτρονιακών μεταπτώσεων σε εσωτερικές στιβάδες ατόμων. Η XRD θεωρείται και τεχνική κρυσταλλογραφίας (Crystallography), καθώς αξιοποιείται για τη μελέτη της κρυσταλλικής δομής των υλικών, δηλαδή για την εύρεση της διάταξης των δομικών συστατικών ενός κρυσταλλικού υλικού. [71,73]

Η αλληλεπίδραση του ηλεκτρικού διανύσματος της ακτινοβολίας X με τα ηλεκτρόνια της ύλης, διαμέσου της οποίας διέρχεται, οδηγεί σε σκέδαση. Όταν οι ακτίνες X σκεδάζονται εντός της οργανωμένης δομής, δηλαδή του κρυσταλλικού πλέγματος ενός κρυστάλλου, πραγματοποιείται συμβολή των σκεδαζόμενων ακτίνων, η οποία μπορεί να είναι ενισχυτική



ή καταστρεπτική, λόγω του ότι οι αποστάσεις μεταξύ των κέντρων σκέδασης είναι της ίδιας τάξης μεγέθους με το μήκος κύματος της ακτινοβολίας. Αποτέλεσμα αυτού του τύπου σκέδασης είναι η περίθλαση της ακτινοβολίας. Επομένως, όταν μονοχρωματική ακτινοβολία ακτίνων X προσπέσει σε ένα κρυσταλλικό πλέγμα, οι περιθλώμενες από τις δομικές μονάδες ακτίνες X υπό τη μορφή κυμάτων θα εμφανίσουν θετική συμβολή όταν η διαφορά της πορείας τους είναι ακέραιο πολλαπλάσιο του μήκους κύματος. Κάτι τέτοιο επιτυγχάνεται για συγκεκριμένες γωνίες μεταξύ της προσπίπτουσας δέσμης και των κρυσταλλικών επιπέδων, οι οποίες καθορίζονται από τις χαρακτηριστικές αποστάσεις μεταξύ των κρυσταλλικών στρωμάτων του υλικού. [71,74]

Όταν μια δέσμη ακτίνων X προσκρούει στην επιφάνεια ενός κρυστάλλου υπό γωνία  $\theta$ , ένα μέρος της σκεδάζεται από τα άτομα του επιφανειακού στρώματος. Η σκέδαση αυτή ομοιάζει φαινομενικά με ανάκλαση της ακτινοβολίας X. Το μη σκεδαζόμενο τμήμα της δέσμης εισέρχεται στο δεύτερο στρώμα των ατόμων, όπου ομοίως ένα τμήμα σκεδάζεται και το υπόλοιπο εισέρχεται στο τρίτο στρώμα, επαναλαμβάνοντας την ίδια διαδικασία, όπως φαίνεται στην Εικόνα 11. Το αθροιστικό αποτέλεσμα αυτής της σκέδασης από τα τακτικά διατεταγμένα κέντρα του κρυστάλλου είναι η περίθλαση της δέσμης.

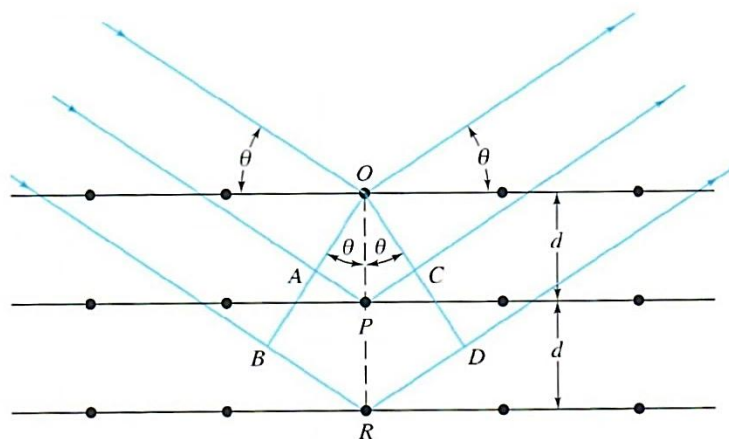
Η σχέση που συνδέει τη φαινομενική ανάκλαση της δέσμης με τη γωνία πρόσπτωσης δίνεται από την εξίσωση Bragg (2):

$$n\lambda = 2d \sin \theta \quad (2)$$

Η εξίσωση (2) χρησιμοποιείται πολύ συχνά με την μορφή (3):

$$\sin \theta = \frac{n\lambda}{2d} \quad (3)$$

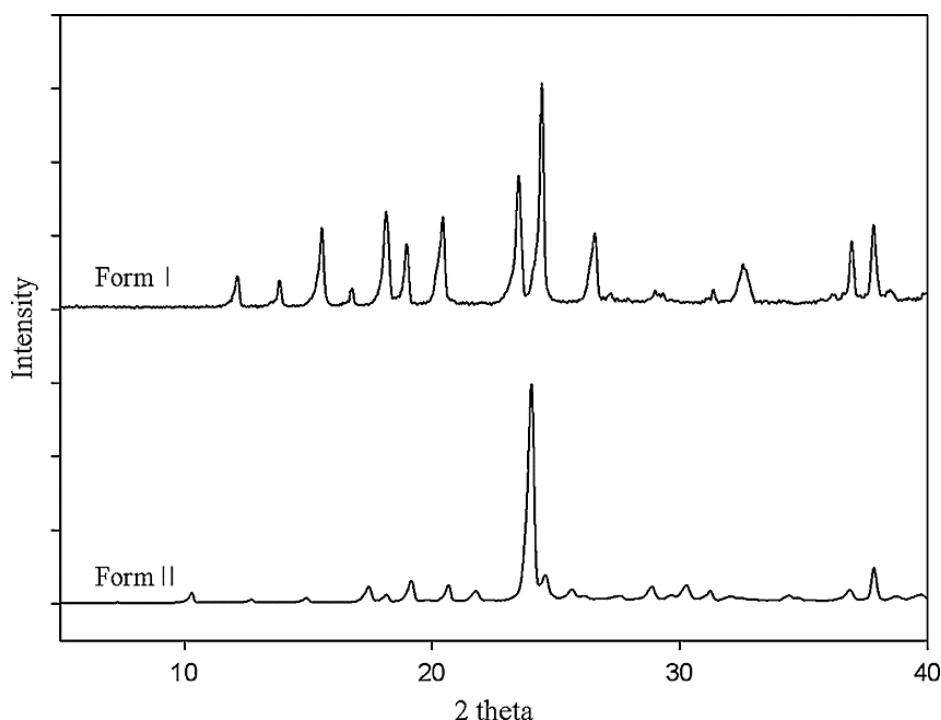
Όπου  $\theta$  η γωνία πρόσπτωσης,  $\lambda$  το μήκος κύματος της μονοχρωματικής ακτινοβολίας,  $n$  ο αριθμός των ανακλάσεων και  $d$  η απόσταση μεταξύ των κρυσταλλικών επιπέδων. Η παραπάνω εξίσωση αποτελεί συνθήκη για την ενισχυτική συμβολή της δέσμης για τη γωνία  $\theta$ . Για οποιαδήποτε άλλη γωνία η συμβολή είναι καταστρεπτική. [71]



Εικόνα 11: Περίθλαση ακτίνων X από κρυσταλλικό πλέγμα. [71]

Σύμφωνα με όλα τα παραπάνω, δεδομένου του ότι κάθε κρυσταλλικό υλικό έχει διαφορετικές αποστάσεις μεταξύ των δομικών του συστατικών, οι γωνίες πρόσπτωσης και περίθλασης (φαινομενικής ανάκλασης) θα είναι μοναδικές. Έτσι, καθίσταται δυνατή η διάκριση δύο διαφορετικών κρυσταλλικών υλικών μεταξύ τους, μέσω της σύγκρισης των περιθλασιογραμμάτων τους, δηλαδή των καταγραφών της έντασης της περιθλώμενης ακτινοβολίας έναντι της γωνίας πρόσπτωσης  $\theta$ . Επιπλέον, η XRD είναι ικανή να διακρίνει κρυσταλλικές μορφές της ίδιας ουσίας, δηλαδή πολύμορφα. [73,74]

Στην Εικόνα 12 παρουσιάζονται τα περιθλασιογράμματα των πολυμόρφων I και II της Παρακεταμόλης. Το περιθλασιόγραμμα (diffraction pattern) είναι το αποτέλεσμα της αλληλεπίδρασης των ακτίνων X με το κρυσταλλικό υλικό κατά την τεχνική της XRD και αποτελεί την καταγραφή της έντασης της περιθλώμενης ακτινοβολίας έναντι της γωνίας πρόσπτωσης  $\theta$ . Για πρακτικούς λόγους, στα περιθλασιογράμματα η καταγραφή της έντασης της ακτινοβολίας πραγματοποιείται έναντι της γωνίας  $2\theta$ , καθώς  $2\theta$  είναι η γωνία μεταξύ της προέκτασης της προσπίπτουσας και της περιθλώμενης ακτινοβολίας, όπως φαίνεται παρακάτω στην Εικόνα 13. Συγκεκριμένα, το διάγραμμα που προκύπτει εμφανίζει κορυφές σε συγκεκριμένες γωνίες ( $2\theta$ ), οι οποίες σχετίζονται με τα επίπεδα ατόμων στον κρύσταλλο, σύμφωνα με το νόμο του Bragg (εξίσωση 2). Να σημειωθεί, πως όσο πιο καλοσχηματισμένος και χωρίς ατέλειες είναι ένας κρύσταλλος που αναλύεται με XRD, τόσο πιο οξείες είναι οι κορυφές που θα προκύψουν στο περιθλασιόγραμμα. [71,75-77]



**Εικόνα 12: Περίθλασιογράμματα των πολυμόρφων I και II της Παρακεταμόλης. [75]**

Υπάρχουν δύο μεθοδολογίες της περίθλασης ακτίνων X που χρησιμοποιούνται: η περίθλαση ακτίνων X μονοκρυστάλλου (single-crystal XRD, SCXRD) και η περίθλαση ακτίνων X κόνεως (powder XRD, XRPD). Οι δύο παραπάνω τεχνικές διαφέρουν όσον αφορά το είδος του προς ανάλυση δείγματος και την ακρίβεια των αποτελεσμάτων που παράγουν. [37]

Πιο αναλυτικά, η SCXRD χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό της λεπτομερούς τρισδιάστατης ατομικής δομής ενός κρυσταλλικού υλικού, επικεντρώνοντας την ανάλυση σε έναν καλά διαμορφωμένο μονοκρύσταλλο. Αυτή η μέθοδος προσφέρει υψηλή ακρίβεια στην ταυτοποίηση της ατομικής διάταξης και είναι ιδιαίτερα χρήσιμη για τη μελέτη περίπλοκων δομών. Αντίθετα, η XRPD εφαρμόζεται σε πολυκρυσταλλικά δείγματα, όπου το υλικό αποτελείται από πολλούς μικρούς κρυστάλλους τοποθετημένους σε τυχαίες κατευθύνσεις. Αν και η XRPD είναι λιγότερο ακριβής στον προσδιορισμό των ατομικών θέσεων σε σύγκριση με τη SCXRD, είναι εξαιρετικά αποτελεσματική για τη μελέτη της αναγνώρισης φάσεων, του πολυμορφισμού και των ιδιοτήτων των υλικών. Επίσης, απαιτεί λιγότερη προετοιμασία δείγματος, γεγονός που την καθιστά κατάλληλη για την ανάλυση ουσιών που δεν σχηματίζουν μεγάλους, τέλεια διαμορφωμένους κρυστάλλους, καθώς το δείγμα αναλύεται υπό μορφή ομογενοποιημένης σκόνης. [78-80]

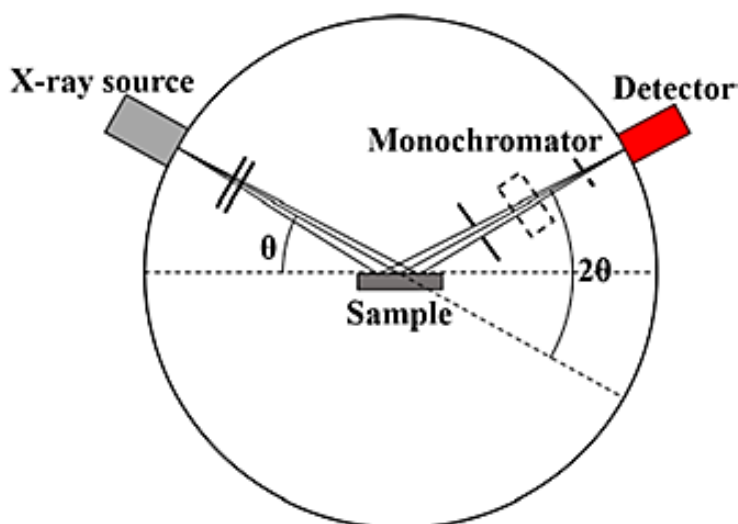
Όσον αφορά τις εφαρμογές των δύο μεθόδων στη φαρμακευτική βιομηχανία, η SCXRD προτιμάται όταν ο στόχος είναι η επίτευξη λεπτομερούς ανάλυσης σε ατομικό επίπεδο, όπως στην ανακάλυψη νέων φαρμακευτικών ουσιών. Αντιθέτως, η XRPD χρησιμοποιείται ευρέως για την αναγνώριση φάσεων και τον ποιοτικό έλεγχο. [78-80]

Ένα βασικό μειονέκτημα της τεχνικής XRD είναι η ευαισθησία στο φαινόμενο του προτιμώμενου προσανατολισμού (preferred orientation), το οποίο ορίζεται ως το φαινόμενο κατά το οποίο οι κρύσταλλοι ή οι κόκκοι ενός υλικού δεν είναι τυχαία προσανατολισμένοι, αλλά παρουσιάζουν μια προτίμηση προς συγκεκριμένες διευθύνσεις. Αυτό μπορεί να επηρεάσει την ένταση των ανακλώμενων ακτίνων X και να οδηγήσει σε λανθασμένα συμπεράσματα σχετικά με την κρυσταλλική δομή του υλικού. Το φαινόμενο παρατηρείται εντονότερα όταν το δείγμα υφίσταται μεγαλύτερη επεξεργασία, όπως σε περιπτώσεις έντονης κονιοποίησης ή συμπίεσης. [81,82]

Η βασική οργανολογία της περίθλασης ακτίνων X περιλαμβάνει τα παρακάτω μέρη:

1. Πηγή ακτίνων X (X-ray source): Αποτελεί το τμήμα του οργάνου που είναι υπεύθυνο για την παραγωγή των ακτίνων X. Η συνηθέστερη πηγή ακτίνων X είναι ο σωλήνας ή λυχνία ακτίνων X, που αποτελείται από έναν σωλήνα-περίβλημα με υψηλό κενό και ένα μέταλλο-στόχο κατασκευασμένο από υλικά όπως χαλκός ή μολυβδαίνιο για παραγωγή ακτίνων X κατάλληλων για ανάλυση.
2. Μονοχρωμάτορας ακτίνων X (monochromator): Πρόκειται για έναν μονοκρύσταλλο που λειτουργεί ως φίλτρο και επιτρέπει την επιλογή του επιθυμητού μήκους κύματος των ακτίνων X.
3. Δειγματοφορέας (sample holder): Είναι το τμήμα όπου τοποθετείται το δείγμα κατά τη διάρκεια της ανάλυσης.
4. Γωνιόμετρο (goniometer): Είναι μια συσκευή που επιτρέπει τη μεταβολή και ακριβή μέτρηση ή ρύθμιση της γωνίας υπό την οποία κινούνται η πηγή ακτίνων X και ο ανιχνευτής.
5. Ανιχνευτής (detector): Ο ανιχνευτής είναι υπεύθυνος για την καταγραφή των περιθλώμενων ακτίνων και τη μετατροπή των δεδομένων σε ψηφιακή μορφή για ανάλυση.
6. Υπολογιστής και λογισμικό ανάλυσης: Το σύστημα συνδέεται με υπολογιστή, ο οποίος συλλέγει και αναλύει τα δεδομένα μέσω ενός κατάλληλου λογισμικού.

Σε πολλές εφαρμογές της XRD, τόσο η πηγή ακτίνων X όσο και ο ανιχνευτής κινούνται πάνω στο γωνιόμετρο με φορά προς τα επάνω κατά την καταγραφή του περιθλασιογράμματος. Επίσης, ο δειγματοφορέας μπορεί να παραμένει σταθερός ή σε άλλες διατάξεις, όπως π.χ. στην XRPD, να περιστρέφεται ώστε να επιτευχθεί καλύτερη κάλυψη της επιφάνειας του δείγματος. [71,81]



Εικόνα 13: Βασική διάταξη ενός περιθλασίμετρου XRD. [83]

### Φασματομετρία Υπέρυθρου (IR)

Η φασματομετρία υπέρυθρου (Infrared Spectroscopy, IR) είναι μία τεχνική, μη καταστρεπτική που χρησιμοποιείται για την ανάλυση των μοριακών δομών των υλικών μέσω της απορρόφησης υπέρυθρης ακτινοβολίας από την ύλη. Η IR βασίζεται στο γεγονός ότι οι δονήσεις των χημικών δεσμών στα μόρια του υλικού απορροφούν σε συγκεκριμένες συχνότητες του υπέρυθρου φάσματος. [84]

Ως υπέρυθρη ακτινοβολία (infrared radiation) χαρακτηρίζεται η ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία με μήκος κύματος από περίπου 0.8 έως 1000  $\mu\text{m}$ , η ενέργεια της οποίας μπορεί να απορροφηθεί από τις κινήσεις των μορίων, όπως είναι η περιστροφή και η δόνηση. Λόγω της διαφοράς στις εφαρμογές και την οργανολογία, το φάσμα της υπέρυθρης περιοχής συνήθως χωρίζεται σε εγγύς υπέρυθρη (near-IR, NIR), όπου παρατηρούνται συνδυασμοί ταλαντώσεων και μεγαλύτερης τάξεως δονήσεις, στη μέση υπέρυθρη (mid-IR, MIR), όπου διεγείρονται θεμελιώδεις ταλαντώσεις και στην άπω υπέρυθρη (far-IR, FIR) περιοχή, η

οποία καλύπτει τις συχνότητες δόνησης της δομής μεγάλων μορίων. Οι τρεις αυτές περιοχές της IR καθώς και οι περιοχές μήκους κύματος, κυματαριθμών και συχνοτήτων που τις χαρακτηρίζουν παρουσιάζονται στον Πίνακα 6. [70,71,84]

Περιοχή	Περιοχή μήκους κύματος ( $\lambda$ ), $\mu\text{m}$	Περιοχή κυματαριθμών ( $\bar{\nu}$ ), $\text{cm}^{-1}$	Περιοχή συχνοτήτων ( $\nu$ ), Hz
Εγγύς (near)	0.78-2.5	12800-4000	$3.8 \times 10^{14} - 1.2 \times 10^{14}$
Μέση (middle)	2.5-50	4000-200	$1.2 \times 10^{14} - 6.0 \times 10^{12}$
Άπω (far)	50-1000	200-10	$6.0 \times 10^{12} - 3.0 \times 10^{11}$

Πίνακας 6: Φασματικές περιοχές υπέρυθρου. [71]

Προκειμένου ένα μόριο να απορροφήσει υπέρυθρη ακτινοβολία, απαιτείται να επέλθει μεταβολή στη διπολική του ροπή, ως συνέπεια της δονητικής ή της περιστροφικής του κίνησης. Η διπολική ροπή καθορίζεται από την τιμή της διαφοράς του φορτίου και την απόσταση μεταξύ δύο φορτισμένων κέντρων. Όταν ένα ασύμμετρο μόριο δονείται, προκύπτει μία σταθερή μεταβολή στη διπολική του ροπή δημιουργώντας ένα πεδίο ικανό να αλληλοεπιδράσει με το ηλεκτρικό πεδίο της ακτινοβολίας. Εάν η συχνότητα της ακτινοβολίας ταυτίζεται με τη συχνότητα μιας φυσικής δόνησης του μορίου, τότε πραγματοποιείται καθαρή μεταφορά ενέργειας, η οποία προκαλεί αλλαγή του πλάτους της μοριακής δόνησης και ακολούθως απορρόφηση ακτινοβολίας. Ομοίως, η περιστροφή ενός ασύμμετρου μορίου γύρω από το κέντρο μάζας του έχει ως αποτέλεσμα μια περιοδική διακύμανση της διπολικής ροπής, που μπορεί να αλληλοεπιδράσει με το πεδίο ακτινοβολίας. Αντίθετα, η απορρόφηση της ακτινοβολίας IR δεν παρατηρείται σε ομοιοπυρηνικά διατομικά μόρια, όπως είναι για παράδειγμα τα  $\text{N}_2$ ,  $\text{O}_2$  κ.λπ. [71]

Εκ των τριών φασματικών περιοχών της υπέρυθρης ακτινοβολίας που αναφέρθηκαν στον Πίνακα 6, η περισσότερο χρησιμοποιούμενη στην ποιοτική ανάλυση είναι εκείνη της μέσης υπέρυθρης (MIR). Η MIR είναι μια τεχνική που παρουσιάζει μεγαλύτερη ευαισθησία στη χημική σύνθεση του δείγματος, παρέχοντας φάσματα που σχετίζονται άμεσα με τους χημικούς δεσμούς και τις λειτουργικές ομάδες. Αντιθέτως, η NIR χρησιμοποιείται κυρίως για ποσοτική ανάλυση, καθώς χαρακτηρίζεται από μεγαλύτερο βάθος διείσδυσης στο δείγμα, παρέχοντας πιο αντιπροσωπευτικά αποτελέσματα που λαμβάνονται από τον συνολικό όγκο του δείγματος. Τέλος, η FIR είναι η λιγότερο διαδεδομένη τεχνική της IR, η

οποία κατά βάση βρίσκει εφαρμογή στην ανάλυση υλικών που περιλαμβάνουν μέταλλα, όπως είναι για παράδειγμα τα μεταλλικά σουλφίδια και τα μεταλλικά σουλφίδια. [70,71,85]

Μία τεχνική λήψης φασμάτων mid-IR, η οποία είναι ιδιαιτέρως διαδεδομένη, είναι η τεχνική της αποσβένουσας ολικής ανάκλασης (Attenuated Total Reflection-ATR). Η ATR επιτρέπει τη λήψη φασμάτων ενός ευρέος πεδίου δειγμάτων, τα οποία παρουσιάζουν δυσκολίες στον χειρισμό, όπως υμένια, λεπτόρρευστα ή παχύρρευστα υγρά, ίνες, σκόνες κ.ά. Η τεχνική βασίζεται στο φαινόμενο της ολικής ανάκλασης, δηλαδή του εγκλωβισμού μίας ακτίνας σε έναν κρύσταλλο, με αποτέλεσμα τη δημιουργία ενός αποσβενόμενου κύματος. Η υπέρυθρη ακτινοβολία ακολούθως συνεχίζει να ταξιδεύει στον κρύσταλλο λόγω της μεγάλης διαφοράς του δείκτη διάθλασης αυτού με τον δείκτη διάθλασης του δείγματος. Πιο αναλυτικά, όταν η υπέρυθρη δέσμη ακτινοβολείται στο δείγμα, το οποίο βρίσκεται σε επαφή με τον κρύσταλλο, ένα μέρος της ανακλάται, ενώ ένα άλλο διεισδύει στο δείγμα σε βάθος 0.5-2  $\mu\text{m}$ . Καθώς ακτινοβολία διεισδύει στο δείγμα, πραγματοποιείται μία αλληλεπίδραση μεταξύ τους με αποτέλεσμα την απορρόφηση των φωτονίων που αντιστοιχούν στις διεγέρσεις των δονητικών επιπέδων του δείγματος, γνωστή ως απορρόφηση ανάκλασης. Το μέρος αυτό του κύματος που διεισδύει στο δείγμα ονομάζεται αποσβενόμενο κύμα. Όπως είναι λογικό, η ακτινοβολία μετά από κάθε ανάκλαση είναι εξασθενημένη λόγω της απορρόφησης μέρους των φωτονίων από το δείγμα. Τα φάσματα ATR είναι παρόμοια αλλά όχι ίδια με τα τυπικά φάσματα απορρόφησης, καθώς παρατηρούνται οι ίδιες κορυφές, οι εντάσεις των οποίων ωστόσο διαφέρουν. [70,71]

Ένα τυπικό φάσμα IR παρουσιάζεται ως γραφική παράσταση της % διαπερατότητας ή απορρόφησης έναντι του κυματαριθμού σε  $\text{cm}^{-1}$ . Οι κορυφές που παρατηρούνται σε ένα φάσμα αντιστοιχούν σε συγκεκριμένες δονήσεις ή κινήσεις των μορίων και μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την ταυτοποίηση χαρακτηριστικών ομάδων ατόμων (π.χ. C-H, O-H, C=O). [86]

Στο σημείο αυτό είναι απαραίτητη η επεξήγηση των όρων διαπερατότητα και κυματαριθμός. Ως διαπερατότητα ενός υλικού (*transmittance*,  $T$ ) ορίζεται το κλάσμα της εξερχόμενης ακτινοβολίας προς την εισερχόμενη ακτινοβολία που διέρχεται από το μέσον:

$$T = \frac{P}{P_0} \quad (4)$$



Όπου,  $P_0$  είναι η ισχύς της εισερχόμενης προς το υλικό δέσμης και  $P$  η ισχύς της εξερχόμενης. Συχνά, η διαπερατότητα εκφράζεται ως σχετικό επί τις εκατό μέγεθος, σύμφωνα με την εξίσωση (5):

$$\%T = \frac{P}{P_0} \times 100 \% \quad (5)$$

Όπως προαναφέρθηκε, στη φασματομετρία υπέρυθρου πραγματοποιείται απορρόφηση της υπέρυθρης ακτινοβολίας από τα μόρια του υλικού. Η απορρόφηση (*absorption*,  $A$ ) συνδέεται με την διαπερατότητα με τον παρακάτω τύπο:

$$A = -\log_{10} T = \log_{10} \frac{P_0}{P} \quad (6)$$

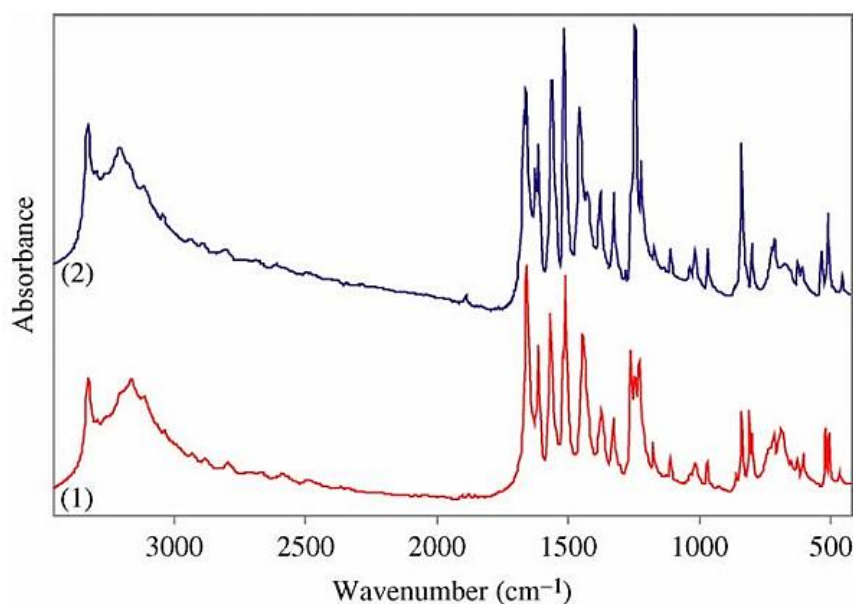
Ο κυματαριθμός, ή αλλιώς κυματικός αριθμός (*wavenumber*,  $\bar{\nu}$ ), ορίζεται ως το αντίστροφο μήκος κύματος σε εκατοστόμετρα, σύμφωνα με την εξίσωση (7):

$$\bar{\nu} = \frac{1}{\lambda} \quad (7)$$

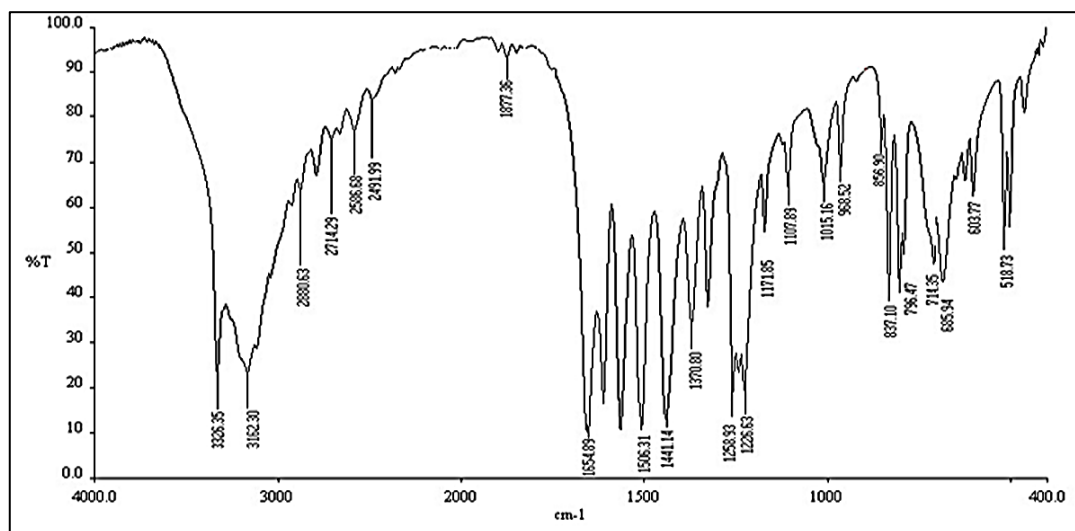
Σε αντίθεση με το μήκος κύματος, ο κυματαριθμός είναι ευθέως ανάλογος προς τη συχνότητα και την ενέργεια της ακτινοβολίας. [71]

Στην Εικόνα 14 απεικονίζονται τα φάσματα απορρόφησης IR των δύο πολυμόρφων I και II της Παρακεταμόλης, ενώ στην Εικόνα 15 απεικονίζεται το φάσμα διαπερατότητας IR της ευρέως χρησιμοποιούμενης μορφής της Παρακεταμόλης.





Εικόνα 14: Φάσματα Απορρόφησης IR των πολυμόρφων I (1) και II (2) της Παρακεταμόλης. [87]



Εικόνα 15: Φάσμα διαπερατότητας IR της Παρακεταμόλης. [88]

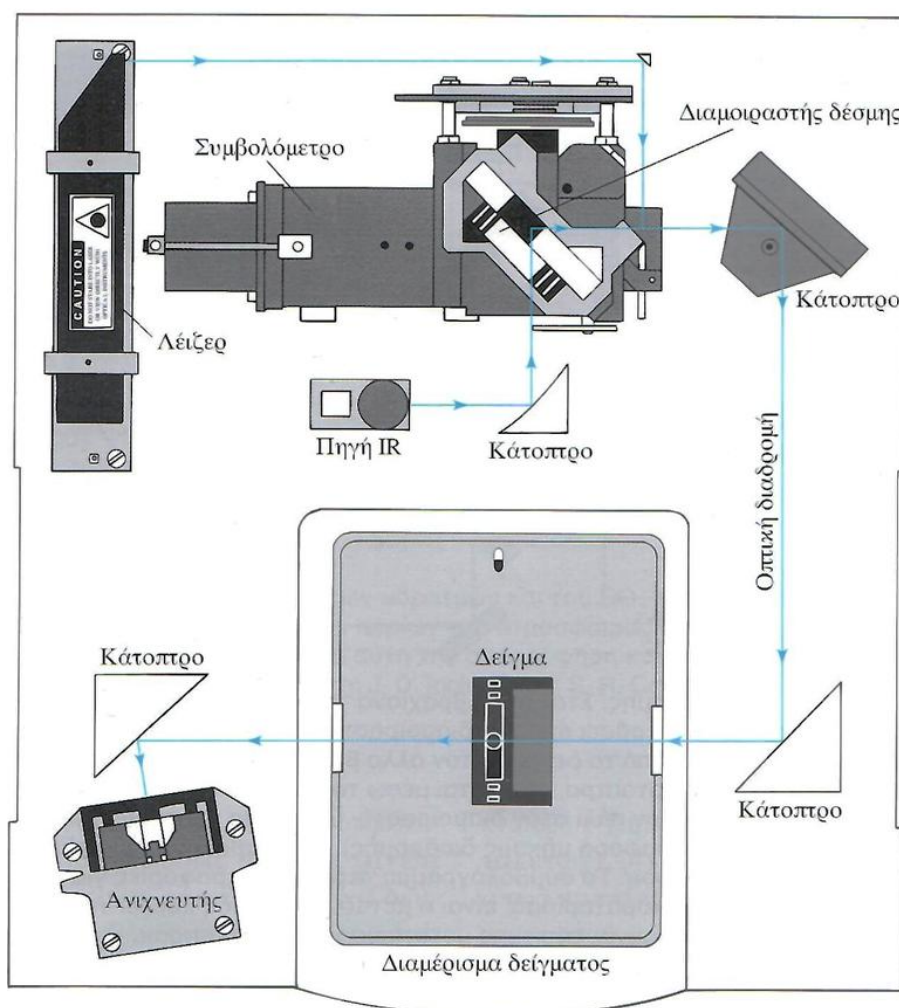
Υπάρχουν τρεις κατηγορίες φωτόμετρων που χρησιμοποιούνται στην IR: (1) τα όργανα διασποράς, τα οποία διαθέτουν μονοχρωμάτορα φράγματος διασποράς της ακτινοβολίας, (2) τα όργανα μετασχηματισμού Fourier (Fourier Transform, FT), που χρησιμοποιούν συμβολόμετρα και (3) τα μη διασπείροντα φωτόμετρα, που χρησιμοποιούν φίλτρα ή ένα αέριο με ικανότητα απορρόφησης. [71]

Από τα παραπάνω το πλέον χρησιμοποιούμενο είναι το φωτόμετρο FTIR. Κατά τον μετασχηματισμό Fourier ένα σήμα που λαμβάνεται στην περιοχή του χρόνου

μετασχηματίζεται σε σήμα στην περιοχή των συχνοτήτων, όπου η ανεξάρτητη μεταβλητή είναι η συχνότητα  $f$  αντί του χρόνου  $t$ . Πιο συγκεκριμένα, στην FTIR η συλλογή των υπέρυθρων φασμάτων πραγματοποιείται με διαφορετικό τρόπο, καθώς αντί να καταγράφεται το ποσό της ενέργειας που απορροφάται για διαφορετικές συχνότητες της ακτινοβολίας, το υπέρυθρο φως οδηγείται στο δείγμα έχοντας πρώτα διαμορφωθεί από ένα συμβολόμετρο. Μετά τη διέλευση από το δείγμα το μετρούμενο σήμα αποτελεί το συμβολογράφημα. [71,72]

Τα φωτόμετρα FTIR μπορεί να είναι είτε απλής είτε διπλής δέσμης, με το πρώτο να χρησιμοποιείται συχνότερα. Ένα τυπικό φωτόμετρο FTIR, όπως αυτό που παρουσιάζεται στην Εικόνα 16, αποτελείται από τα παρακάτω μέρη:

1. Πηγή λέιζερ (laser source): Πρόκειται για μία πηγή ακτινοβολίας λέιζερ He-Ne.
2. Πηγή υπέρυθρης ακτινοβολίας (IR source): Επιπλέον της πηγής λέιζερ χρησιμοποιείται μία πηγή υπέρυθρης ακτινοβολίας.
3. Συμβολόμετρο (interferometer): Το συμβολόμετρο χρησιμοποιείται με σκοπό τον διαχωρισμό της δέσμης ακτινοβολίας σε δύο περίπου ίσης ισχύος δέσμες, οι οποίες στη συνέχεια ανασυντίθενται, επιτρέποντας την ανάλυση δειγμάτων με μεγαλύτερη ακρίβεια. Τα περισσότερα όργανα FTIR που κυκλοφορούν στο εμπόριο χρησιμοποιούν το συμβολόμετρο Michelson.
4. Δειγματοφορέας (sample holder): Αποτελεί το τμήμα εκείνο του συστήματος όπου τοποθετείται το δείγμα.
5. Ανιχνευτής (detector): Ο ανιχνευτής του συστήματος συλλέγει το σήμα και το μετατρέπει σε ηλεκτρικό.
6. Υπολογιστής και λογισμικό ανάλυσης: Το σύστημα καταλήγει σε έναν υπολογιστή, ο οποίος συλλέγει και αναλύει τα δεδομένα με τη βοήθεια ενός λογισμικού. [71,89]



Εικόνα 16: Διάταξη ενός βασικού φασματόμετρου FTIR. [71]

### Φασματοσκοπία Raman

Η φασματοσκοπία Raman είναι μια μη καταστρεπτική τεχνική που χρησιμοποιείται για να παρέχει λεπτομερείς πληροφορίες σχετικά με τη μοριακή δομή, τη χημική σύνθεση και τις ιδιότητες των υλικών. Η τεχνική βασίζεται στο φαινόμενο της σκέδασης Raman (Raman scattering), η οποία αναφέρεται στην ανελαστική σκέδαση φωτονίων, ή αλλιώς κβάντων φωτός, από κάποια διέγερση του υλικού. [90]

Με τον όρο σκέδαση περιγράφεται το φαινόμενο της στιγμιαίας κατακράτησης της ακτινοβολούμενης ενέργειας από τα άτομα, μόρια ή ιόντα ενός υλικού, η οποία ακολουθείται από την επανεκπομπή της προς όλες τις κατευθύνσεις, όταν τα σωματίδια επανέρχονται στην αρχική τους κατάσταση. Στην ανελαστική σκέδαση, παρατηρείται μεταβολή συχνότητας και φάσης της διερχόμενης ακτινοβολίας, κάτι που οφείλεται σε

αλλαγές στη δονητική κατάσταση του μορίου. Ως αποτέλεσμα, η ενέργεια των σκεδασμένων φωτονίων μεταβάλλεται κατά την αλληλεπίδραση με τα μόρια του υλικού. Αξίζει να σημειωθεί ότι η σκέδαση Raman οφείλεται σε κβαντισμένες δονητικές μεταβολές του ίδιου τύπου με αυτές που συνδέονται και με την απορρόφηση υπέρυθρης ακτινοβολίας, που περιεγράφηκε στην προηγούμενη παράγραφο. [71,91]

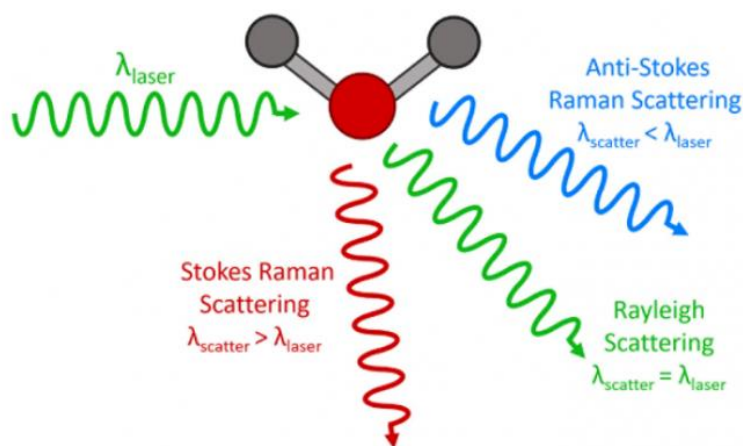
Πιο συγκεκριμένα, όταν μονοχρωματική ακτινοβολία, συνήθως από λείζερ ορατού (Vis) ή εγγύς υπέρυθρου (near-IR), προσπίπτει στο υλικό, το μεγαλύτερο μέρος της ακτινοβολίας σκεδάζεται ελαστικά χωρίς μεταβολή της ενέργειας. Το είδος αυτής της σκέδασης ονομάζεται σκέδαση Rayleigh (Rayleigh scattering). Ωστόσο, ένα μικρό ποσοστό της ακτινοβολίας υφίσταται ανελαστική σκέδαση, όπου η ενέργεια των σκεδασμένων φωτονίων αλλάζει λόγω της αλληλεπίδρασης με τις διεγέρσεις (δονητικές καταστάσεις) των μορίων. Όταν τα φωτόνια αλληλοεπιδρούν με ένα δείγμα, μπορούν είτε να “χάσουν” είτε να “κερδίσουν” ενέργεια ανάλογα με τις δονήσεις των μορίων του υλικού. Τα φαινόμενα αυτά, ονομάζονται σκέδαση Stokes (Stokes scattering) και σκέδαση anti-Stokes (anti-Stokes scattering), αντίστοιχα. [71,92,93]

Πιο αναλυτικά, κατά τη σκέδαση Stokes το μόριο που αλληλοεπιδρά με ένα φωτόνιο μπορεί να απορροφήσει ενέργεια και να διεγερθεί από τη θεμελιώδη του κατάσταση σε υψηλότερη δονητική κατάσταση. Η ακτινοβολία που εκπέμπεται, ή αλλιώς σκεδάζεται, ύστερα από αυτήν την αλληλεπίδραση θα έχει χαμηλότερη ενέργεια, ή αλλιώς μικρότερη συχνότητα και μεγαλύτερο μήκος κύματος, από την εισερχόμενη ακτινοβολία, δηλαδή την ακτινοβολία διέγερσης. Αντίθετα, η σκέδαση anti-Stokes συμβαίνει όταν ένα μόριο που βρίσκεται ήδη σε διεγερμένη κατάσταση αλληλοεπιδρά με ένα φωτόνιο. Κατά την αλληλεπίδραση αυτή το μόριο μεταπίπτει σε χαμηλότερη ενεργειακή κατάσταση και εκπέμπεται ενέργεια υψηλότερης ενέργειας, ή αλλιώς μεγαλύτερης συχνότητας και μικρότερου μήκους κύματος, από εκείνη της ακτινοβολίας διέγερσης. Οι εκπομπές αυτές υψηλότερης και χαμηλότερης ενέργειας δημιουργούν ένα μοναδικό φάσμα, γνωστό ως φάσμα Raman. Αυτό το φάσμα παρέχει ένα “δακτυλικό αποτύπωμα” του υλικού, που μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την ταυτοποίηση διαφόρων υλικών, τόσο οργανικών όσο και ανόργανων. [71,92-94]

Τα φάσματα Raman παρουσιάζουν την ένταση της σκεδαζόμενης ακτινοβολίας ως προς τη μετατόπιση Raman (*Raman shift*,  $\Delta\bar{\nu}$ ). Η μετατόπιση Raman αναφέρεται στη διαφορά της συχνότητας ή του μήκους κύματος μεταξύ της ακτινοβολίας διέγερσης και της ακτινοβολίας εκπομπής και εκφράζεται συνήθως ως διαφορά στους κυματαριθμούς ( $\text{cm}^{-1}$ ). Όπως μπορεί

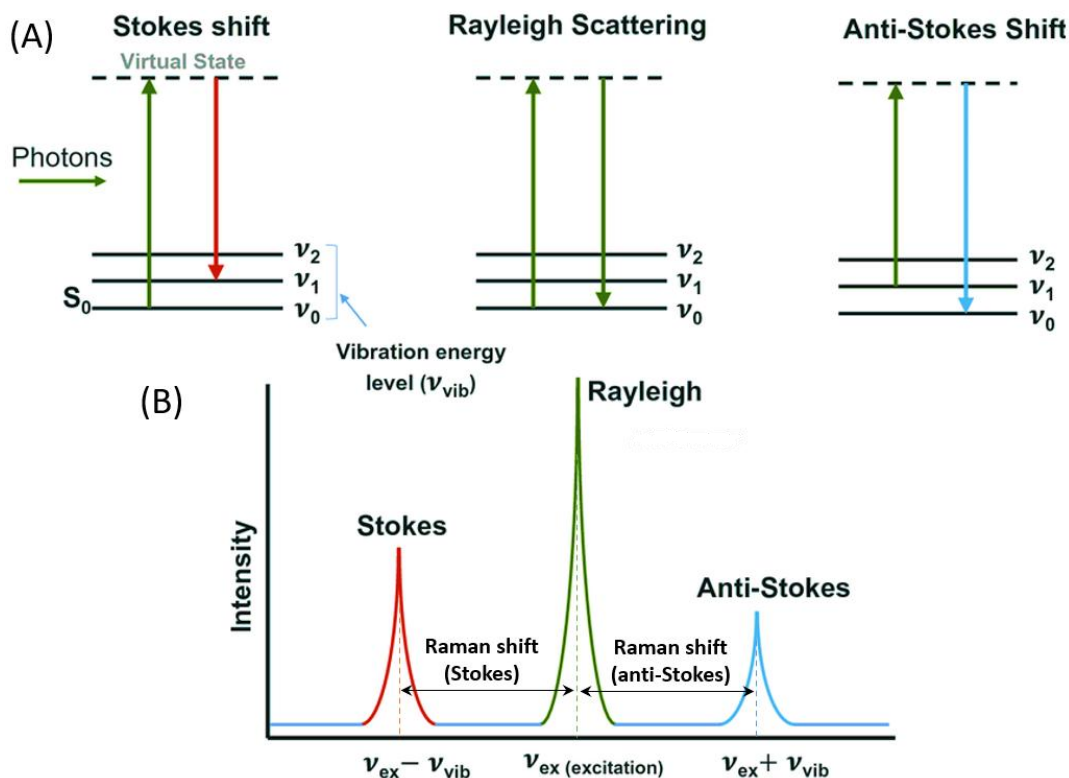
να γίνει κατανοητό με βάση τα παραπάνω, η μετατόπιση Raman μπορεί να είναι είτε θετική (Stokes shift) είτε αρνητική (anti-Stokes shift). [92-94]

Στην Εικόνα 17 παρουσιάζεται σχηματικά το φαινόμενο της σκέδασης Raman. Όπως φαίνεται, ύστερα από ακτινοβολία ενός υλικού τα μόρια μπορούν να εκπέμψουν ακτινοβολία είτε ίδιας ενέργειας (Rayleigh scattering), είτε διαφορετικής από εκείνη της ακτινοβολίας διέγερσης (Stokes και anti-Stokes scattering). [71,95]



Εικόνα 17: Το φαινόμενο της σκέδασης Raman και της σκέδασης Rayleigh. [95]

Στο Σχήμα Α της Εικόνας 18 παρουσιάζονται οι μεταπτώσεις των μορίων και η αντίστοιχη εκπομπή ακτινοβολίας που πραγματοποιείται κατά τη σκέδαση Raman, ενώ στο Σχήμα Β απεικονίζονται χαρακτηριστικά οι κορυφές Stokes, anti-Stokes και Rayleigh. Όταν ένα μόριο βρίσκεται στη θεμελιώδη του κατάσταση ( $S_0$ ), θεωρείται πως βρίσκεται στη θεμελιώδη δονητική του στάθμη ( $\nu_0$ ). Σε αυτήν την κατάσταση το μόριο μπορεί να απορροφήσει ένα φωτόνιο (photon) ενέργειας  $h\nu_{ex}$  και ακολούθως να επανεκπέμψει ένα φωτόνιο ενέργειας  $h(\nu_{ex} - \nu_v)$ . Στην περίπτωση αυτή, στην οποία η σκεδαζόμενη ακτινοβολία είναι μικρότερης συχνότητας από την ακτινοβολία διέγερσης, παρατηρείται σκέδαση Stokes. Όταν αντιθέτως, ένα μόριο βρίσκεται σε διεγερμένη κατάσταση, δηλαδή σε διεγερμένη δονητική στάθμη ( $\nu_1$ ), τότε έπειτα από απορρόφηση ενέργειας  $h\nu_{ex}$  μπορεί να επανεκπέμψει σκεδαζόμενη ακτινοβολία ενέργειας  $h(\nu_{ex} + \nu_v)$ . Σε αυτή τη περίπτωση, όπου η σκεδαζόμενη ακτινοβολία είναι υψηλότερης συχνότητας από την ακτινοβολία διέγερσης παρατηρείται η σκέδαση anti-Stokes (anti-Stokes shift). Λόγω του ότι το μήκος κύματος διέγερσης βρίσκεται αρκετά μακριά από τη ζώνη απορρόφησης, η διέγερση θεωρείται πως αναφέρεται σε εικονικές καταστάσεις ενεργειακής στάθμης (virtual state). [71,95,96]

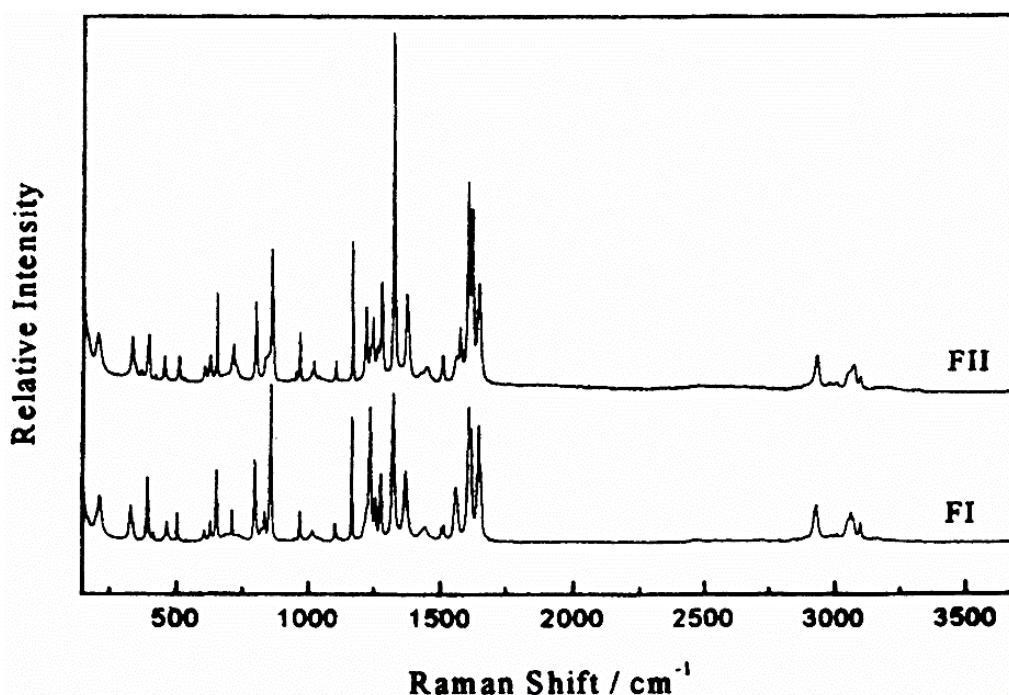


Εικόνα 18: (Α) Προέλευση φασμάτων Raman, (Β) Κορυφές Stokes και anti-Stokes. [95,96]

Παρόλο που το φαινόμενο της σκέδασης Raman ανακαλύφθηκε το 1928, η φασματοσκοπία Raman δεν αποτέλεσε μια ευρέως χρησιμοποιούμενη τεχνική από τους χημικούς έως το 1960, οπότε και έγιναν διαθέσιμα τα λέιζερ, που χρησιμοποιούνται για τη λήψη φασμάτων. Ωστόσο, τα τελευταία χρόνια η φασματοσκοπία Raman έχει αποτελέσει μια τεχνική ικανή για την ταυτοποίηση πολυμόρφων διαφόρων ουσιών, καθώς και για τον έλεγχο της κρυσταλλικής μορφής τους [72,97-99].

Στην Εικόνα 19 παρουσιάζονται τα φάσματα Raman των δύο πολυμόρφων της Παρακεταμόλης.





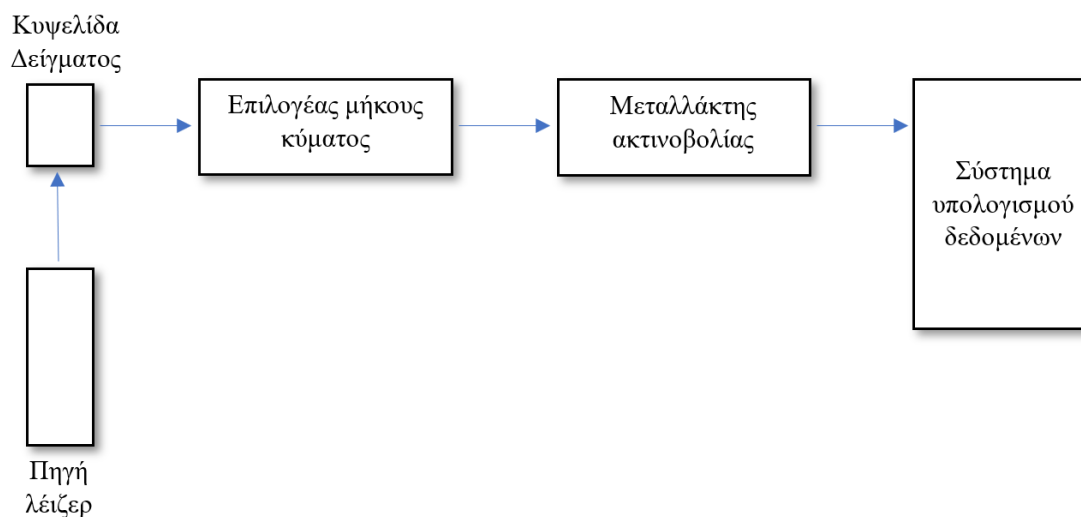
Εικόνα 19: Φάσματα Raman των πολυμόρφων I (FI) και II (FII) της Παρακεταμόλης. [100]

Στο σχήμα της Εικόνας 20 παρουσιάζεται η οργανολογία ενός φασματομέτρου Raman, η οποία αποτελείται από:

1. Πηγή διέγερσης (source): Συνήθως πρόκειται για πηγή λέιζερ (laser source), καθώς για την παρατήρηση του φαινομένου της σκέδασης Raman απαιτείται μεγάλη ένταση ακτινοβολίας.
2. Δειγματοφορέας (sample holder): Πρόκειται για το τμήμα του οργάνου όπου τοποθετείται το δείγμα.
3. Επιλογέας μήκους κύματος: Αναφέρεται και ως μονοχρωμάτορας (monochromator) και χρησιμοποιείται για να απομονωθεί η επιθυμητή φασματική περιοχή της ακτινοβολίας.
4. Διαχωριστής δέσμης (beam splitter): Ο διαχωριστής δέσμης κατευθύνει τη δέσμη λέιζερ προς το δείγμα και επιτρέπει τη συλλογή της σκεδαζόμενης ακτινοβολίας Raman.
5. Φίλτρα (Filters / Lens): Συχνά χρησιμοποιούνται φίλτρα τα οποία είναι υπεύθυνα για την αποκοπή του σήματος λόγω της σκέδασης Rayleigh, επιτρέποντας έτσι την ανίχνευση του ασθενέστερου σήματος λόγω της σκέδασης Raman.

6. Ανιχνευτής ή αλλιώς Μεταλλάκτης (Detector): Χρησιμοποιείται για να καταγράψει την ένταση του διασκορπισμένου φωτός, να μετατρέψει το σήμα σε ανάλογο ηλεκτρικό σήμα και να δημιουργήσει το φάσμα.
7. Υπολογιστής και Λογισμικό Ανάλυσης: Τα φασματομετρικά δεδομένα συλλέγονται και αναλύονται από έναν υπολογιστή που συνδέεται με το υπόλοιπο σύστημα. [72,92-94]

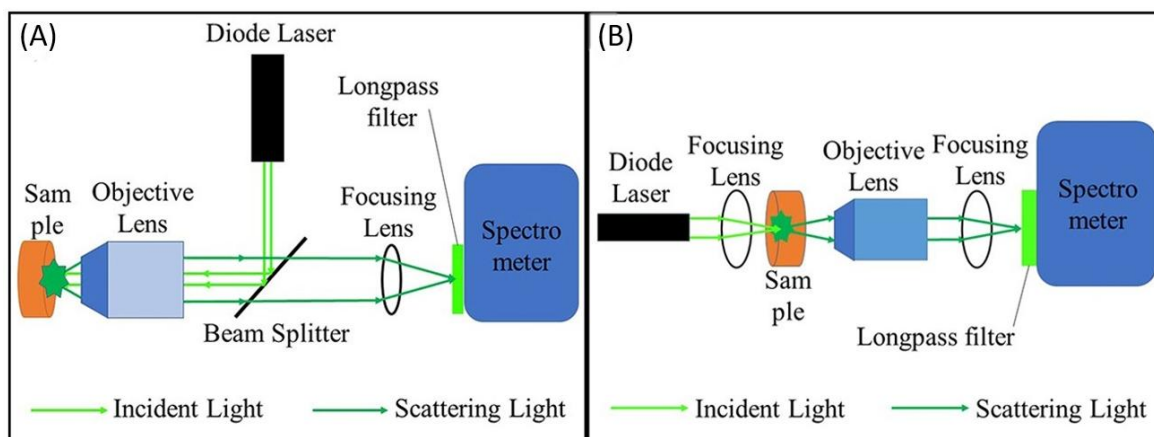
Στο σημείο αυτό αξίζει να σημειωθεί πως συνήθως η σκέδαση Raman μετρείται σε γωνία  $90^\circ$ , έτσι ώστε να αποφεύγεται η μέτρηση της ακτινοβολίας της πηγής. [70]



**Εικόνα 20: Βασική οργανολογία της φασματοσκοπίας Raman. [71]**

Η φασματοσκοπία Raman χωρίζεται σε δύο βασικές μεθοδολογίες με βάση τη διάταξη της παραπάνω οργανολογίας, στη φασματοσκοπία Raman οπισθοσκέδασης (backscattering Raman, BR) και στη φασματοσκοπία Raman διαπερατότητας (transmission Raman spectroscopy, TRS). Η πρώτη αποτελεί την κλασσική και πιο διαδεδομένη μεθοδολογία, στην οποία η πηγή ακτινοβολίας και ο ανιχνευτής βρίσκονται γενικά τοποθετημένοι στην ίδια κατεύθυνση. Αντίθετα, στην TRS η πηγή και ο ανιχνευτής βρίσκονται σε αντίθετες κατευθύνσεις. Όπως φαίνεται και στην Εικόνα 21, στην BR η πηγή ακτινοβολεί το δείγμα και έπειτα η σκεδαζόμενη ακτινοβολία επιστρέφει κατά κάποιο τρόπο πίσω προς τον ανιχνευτή. Το αντίθετο συμβαίνει στην TRS, όπου η πηγή και ο ανιχνευτής βρίσκονται θεωρητικά σε μία σειρά, με αποτέλεσμα η ακτινοβολία από την πηγή να διέρχεται από το δείγμα και να καταλήγει στον ανιχνευτή. [101,102]





**Εικόνα 21: Μεθοδολογίες Raman. (A) Raman οπισθοσκέδασης (BR), (B) Raman διαπερατότητας (TRS). [103]**

Αν και περισσότερο διαδεδομένη, η BR είναι καταλληλότερη για την επιφανειακή ανάλυση ομογενοποιημένων δειγμάτων, τα οποία χαρακτηρίζονται από ομοιομορφία τόσο επιφανειακά όσο και εσωτερικά, ενώ παρουσιάζει έντονο θόρυβο που οφείλεται στο φαινόμενο του φθορισμού των δειγμάτων. Ο θόρυβος αυτός είναι χαρακτηριστικά χαμηλότερος στην TRS, η οποία χαρακτηρίζεται από μεγάλο βάθος διείσδυσης και είναι ιδανική για την ανάλυση λεπτών δειγμάτων που δεν παρουσιάζουν απορρόφηση ακτινοβολίας. Ακόμη, λόγω των παραπάνω η TRS είναι καταλληλότερη για την ποσοτική ανάλυση δειγμάτων σε σχέση με την BR. [101,102]

Μία εξελιγμένη μορφή του φασματόμετρου Raman αποτελεί το φασματόμετρο Raman με μετατροπή Fourier (Fourier Transform Raman Spectrometer). Ένα φασματόμετρο FT-Raman διαθέτει επιπλέον της παραπάνω οργανολογίας ένα συμβολόμετρο Michelson, το οποίο είναι υπεύθυνο για τη διαμόρφωση ακτινοβολιών της οπτικής περιοχής. Ακόμη, η πηγή ακτινοβολίας που χρησιμοποιείται για την FT-Raman είναι συνεχούς κύματος και σταθερότερη. [71]

## 2.2 Μελέτη των πολυμορφισμών της Πιρακετάμης

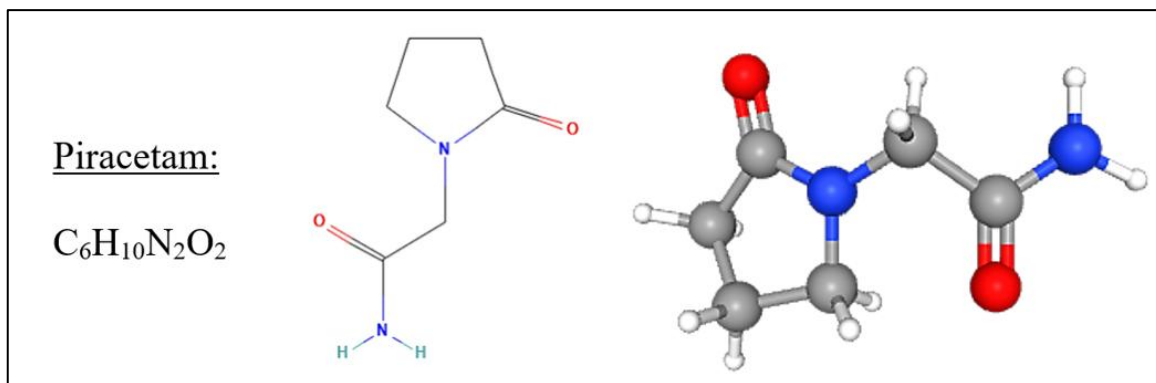
Ένας μεγάλος αριθμός φαρμακευτικών δραστικών ουσιών, καθώς και οι πολυμορφισμοί τους, έχουν μελετηθεί εκτενώς με τη χρήση των τεχνικών της περίθλασης ακτίνων X (XRD), της υπέρυθρης φασματοσκοπίας (IR), και της φασματοσκοπίας Raman. Οι τεχνικές αυτές έχουν χρησιμοποιηθεί για την ανάλυση της κρυσταλλικής δομής και της μοριακής

ταυτότητας αυτών των ενώσεων, παρέχοντας πολύτιμα δεδομένα για τη φυσική και χημική τους συμπεριφορά.

Μία φαρμακευτική δραστική ουσία που έχει μελετηθεί ως πρότυπη API είναι η Πιρακετάμη, η οποία παρουσιάζει διάφορα πολύμορφα. Η μελέτη των πολυμορφισμών της έχει πραγματοποιηθεί με μία πληθώρα τεχνικών αναλυτικής χημείας. Στην παρούσα ενότητα θα εξεταστεί η μελέτη των πολυμορφισμών της Πιρακετάμης με την εφαρμογή φασματοσκοπίας υπέρυθρου (IR), φασματοσκοπίας Raman και περίθλασης ακτίνων X (XRD). [104]

## 2.2.1 Πιρακετάμη και πολυμορφισμοί

Η Πιρακετάμη (Piracetam, PCM) είναι ένα κυκλικό παράγωγο του νευροδιαβιβαστή γ-αμινοβουτυρικού οξέος (GABA), που ανήκει στην ομάδα των ρακεταμίδων. Η χημική ονομασία της Πιρακετάμης είναι ακεταμίδιο της 2-όξο-1-πυρρολιδίνης (2-oxo-1-pyrrolidine acetamide) και μοιράζεται την ίδια δομή 2-όξο-πυρρολιδόνης με το πυρογλουταμικό οξύ. Ο χημικός τύπος και η δομή του μορίου της Πιρακετάμης παρουσιάζονται στην Εικόνα 22. [105,106]



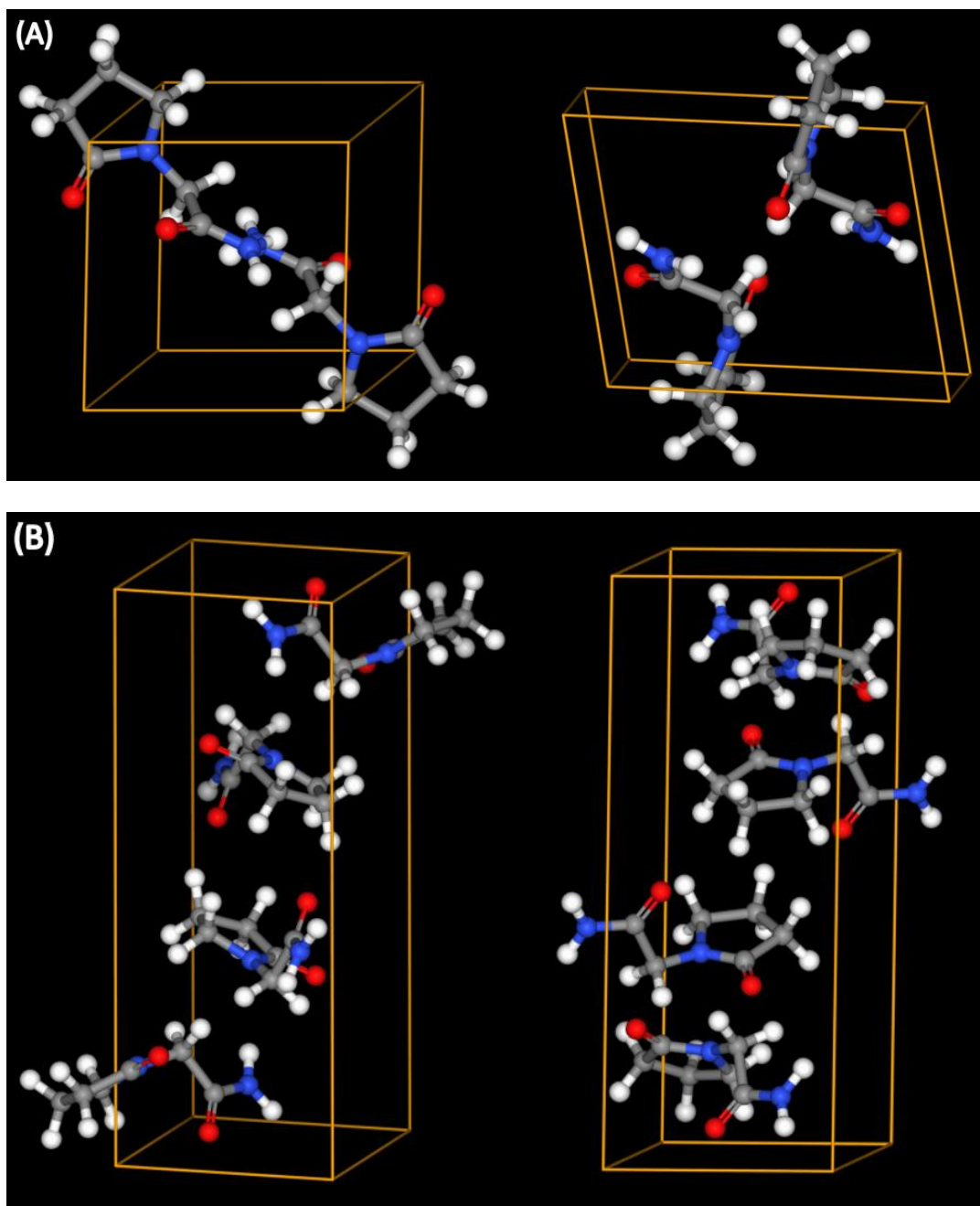
Εικόνα 22: Χημικός τύπος και δομή (δισδιάστατη και τρισδιάστατη) της Πιρακετάμης. [106]

Η Πιρακετάμη ήταν το πρώτο νοοτροπικό φάρμακο, δηλαδή ένας παράγοντας που δρα στη γνωστική λειτουργία χωρίς να προκαλεί καταστολή ή διέγερση, το οποίο κυκλοφόρησε αρχικά το 1971 από την UCB Pharma με την εμπορική ονομασία Nootropil®. Αν και οι μηχανισμοί δράσης της δεν έχουν πλήρως αποσαφηνιστεί, είναι γνωστό πως επηρεάζει τις νευρικές και αγγειακές λειτουργίες έχοντας νευροπροστατευτικές και αντισπασμωδικές ιδιότητες. Ενδιαφέρον επίσης αποτελεί το γεγονός ότι η δράση της Πιρακετάμης διαφέρει

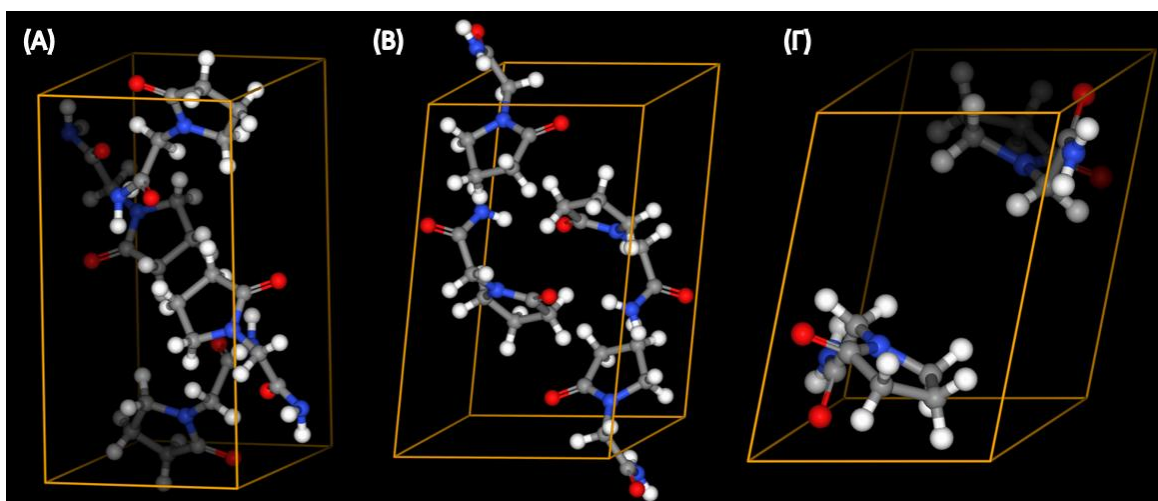
σημαντικά από εκείνη του ενδογενούς GABA, το οποίο αποτελεί σημαντικό ανασταλτικό νευροδιαβιβαστή. Η αποτελεσματικότητα της Πιρακετάμης έχει τεκμηριωθεί σε γνωστικές διαταραχές, άνοια, ιλίγγους, στη φλοιική μυοκλονία, τη δυσλεξία και τη δρεπανοκυτταρική αναιμία, αν και η κλινική της εφαρμογή δεν είναι ακόμη καθιερωμένη. Ακόμη, έχει αναφερθεί ότι βελτιώνει τη νευρική πλαστικότητα, ενώ επιδρά και στο αγγειακό σύστημα, μειώνοντας την προσκόλληση των ερυθροκυττάρων στο ενδοθήλιο και βελτιώνοντας τη μικροκυκλοφορία. [105,106,108,109]

Έχουν αναγνωριστεί πέντε πολύμορφα της Πιρακετάμης, που χαρακτηρίζονται ως FI, FII, FIII, FIV και FV και δύνανται να υπάρχουν σε μονοένυδρη (monohydrate) και διένυδρη (dihydrate) μορφή. Οι μορφές FIV και FV μπορούν να σχηματιστούν μόνο σε συνθήκες υψηλής πίεσης (άνω των 0,5 GPa), ενώ οι FI, FII και FIII μπορούν να μελετηθούν σε κανονικές συνθήκες. Η FI είναι εξαιρετικά ασταθής σε συνθήκες περιβάλλοντος και μπορεί να σχηματιστεί ύστερα από θέρμανση της FII ή της FIII σε θερμοκρασία 400 K, ακολουθούμενη από ταχεία ψύξη σε RT. Παρόλα αυτά μετατρέπεται ξανά στην μορφή FII εντός λίγων ωρών, κάτι που την καθιστά μη πρακτική. Η FII είναι τρικλινής μετασταθής μορφή, ενώ η FIII είναι μονοκλινής και αποτελεί τη σταθερή μορφή υπό κανονικές συνθήκες, δηλαδή εκείνη που ευνοείται θερμοδυναμικά, καθώς και την πλέον χρησιμοποιούμενη στα φαρμακευτικά σκευάσματα. Οι FI, FII και FIII σχετίζονται εναντιοτροπικά (enantiotropically), δηλαδή μπορούν να μετατραπούν η μία στην άλλη υπό συγκεκριμένες συνθήκες. Έτσι, ενώ η μορφή FII είναι ικανή να διατηρεί την κρυσταλλική της δομή υπό συνθήκες περιβάλλοντος, μπορεί να μετατρέπεται στην FI σε χαμηλότερη θερμοκρασία συγκριτικά με την FIII, κάτι που μεταξύ άλλων καθιστά την FIII σταθερότερη μορφή από την FII. [110-114]

Στην Εικόνα 23 παρουσιάζονται οι δομές της μοναδιαίας κυψελίδας των κρυσταλλικών μορφών FII και FIII της Πιρακετάμης ενώ στην Εικόνα 24 οι κρυσταλλικές μορφές των άλλων τριών ασταθών πολυμόρφων της (FI, FIV, FV).



Εικόνα 23: Δομή μοναδιαίας κυψελίδας του πολυμόρφου FII (A) και FIPI (B) της Πιρακετάμης.  
[113-116]



Εικόνα 24: Κρυσταλλική δομή μοναδιαίας κυψελίδας των Πολυμορφισμών FI (Α), FIV (Β) και FV (Γ) της Πιρακετάμης. [117-120]

Οι παραπάνω εικόνες των κρυσταλλικών μορφών FI-FV αποκτήθηκαν με τη χρήση της βάσης δεδομένων CCDC, σε συνδυασμό με στοιχεία από δημοσιευμένες επιστημονικές μελέτες. Αξίζει να σημειωθεί πως κατά την αναζήτηση των κρυσταλλικών δομών βρέθηκαν αρκετές καταχωρήσεις στη βάση δεδομένων CCDC που αντιστοιχούν στην ίδια κρυσταλλική μορφή ή αλλιώς στο ίδιο κρυσταλλικό πολύμορφο. Οι διαφορετικές αυτές καταχωρήσεις υπάρχουν κυρίως εξαιτίας της εφαρμογής διαφορετικών πειραματικών συνθηκών, νέων εξελιγμένων κατά καιρούς μεθόδων καθώς και λόγω της χρήσης διαλυτών σε ορισμένες μελέτες. [121,122]

Στον Πίνακα 7 παρατίθενται αναλυτικά τα χαρακτηριστικά της μοναδιαίας κυψελίδας των δύο βασικών πολυμόρφων της Πιρακετάμης.

Πολύμορφο	Συμμετρία	Παράμετροι κυψελίδας (Å,°)
FII	Τρικλινής	$a = 6.403, b = 6.618, c = 8.556$ $\alpha = 79.85, \beta = 102.39, \gamma = 91.09$
FIII	Μονοκλινής	$a = 6.525, b = 6.440, c = 16.463$ $\alpha = 90, \beta = 92.19, \gamma = 90$

Πίνακας 7: Κρυσταλλογραφικά χαρακτηριστικά των κυρίαρχων πολυμορφισμών της Πιρακετάμης. [113]

Πρόσφατα, ανακαλύφθηκε ένα ακόμα μετασταθές πολύμορφο της Πιρακετάμης, το FVI, το οποίο βρίσκεται υπό μελέτη. Το FVI κρυσταλλώνεται σε θερμοκρασίες 283-298 K μέσα σε

αιθανόλη (EtOH) και ισοπροπανόλη (IPrOH) και μετατρέπεται στη μορφή FII εντός 15 λεπτών και 6 ωρών αντιστοίχως. [117]

Στο συγκεκριμένο σημείο αξίζει να αναφερθεί ο ρόλος της αιθανόλης και της ισοπροπανόλης στη συμπεριφορά του συγκεκριμένου πολυμόρφου της Πιρακετάμης. Η δημιουργία του πολύμορφου FVI της Πιρακετάμης εντός αιθανόλης και ισοπροπανόλης οφείλεται σε διάφορους θερμοδυναμικούς και θερμοκινητικούς παράγοντες που σχετίζονται με τις ιδιότητες των διαλυτών. Όπως αναφέρθηκε στην παράγραφο 1.2, η θερμοκινητική και η θερμοδυναμική σταθερότητα αποτελούν ιδιαίτερως σημαντικούς παράγοντες για την κατανόηση των μετατροπών μεταξύ των διαφόρων πολυμόρφων μιας ουσίας καθώς και του χρόνου που απαιτείται για αυτές τις μετατροπές. [24,37,117]

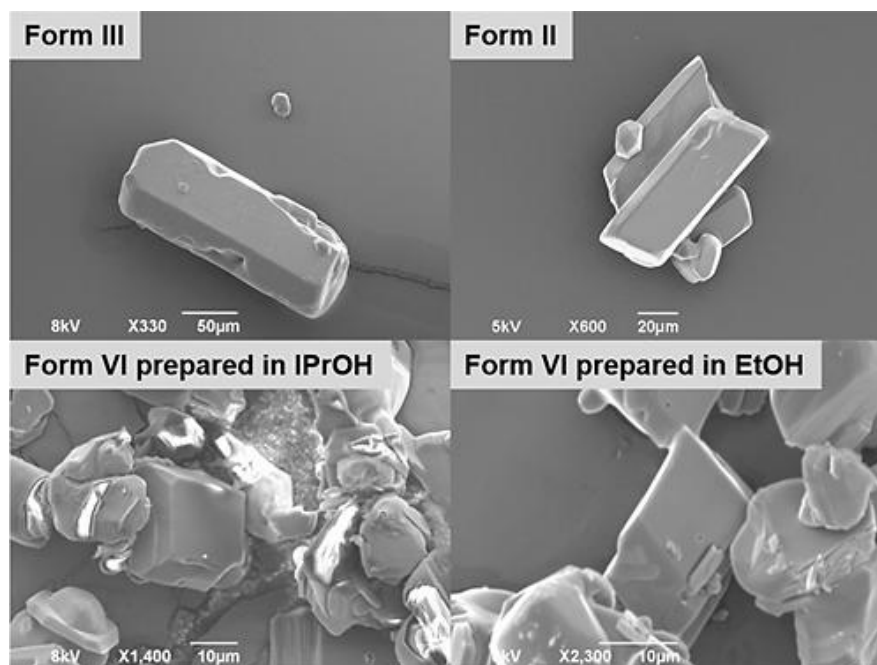
Στην αιθανόλη και την ισοπροπανόλη η διεπιφανειακή ενέργεια (interfacial energy) μεταξύ του πολυμόρφου FVI και του διαλύτη είναι χαμηλότερη. Αυτό μειώνει το ενεργειακό εμπόδιο για τη δημιουργία νέων κρυστάλλων του FVI, ευνοώντας τον σχηματισμό τους εντός των δύο αυτών διαλυτών. Με τον όρο διεπιφανειακή ενέργεια, ορίζεται η ενέργεια που απαιτείται για την δημιουργία μίας επιφάνειας επαφής μεταξύ δύο φάσεων, όπως για παράδειγμα μίας κρυσταλλικής επιφάνειας και ενός διαλύματος. [117]

Η αιθανόλη αποτελεί έναν ισχυρό διαλύτη όπου η διεπιφανειακή ενέργεια είναι χαμηλότερη, ενώ η διαλυτότητα και ο προσθετικός παράγοντας (pre-exponential factor), μια παράμετρος που σχετίζεται με τη συχνότητα και την ευκολία με την οποία ευθυγραμμίζονται τα μόρια ώστε να σχηματίσουν έναν κρύσταλλο, είναι υψηλότεροι συγκριτικά με την ισοπροπανόλη. Ο συνδυασμός των τριών αυτών παραμέτρων, έχει ως αποτέλεσμα το πολύμορφο FVI να μετατρέπεται πολύ γρηγορότερα στην μορφή FII εντός αιθανόλης, καθώς:

1. Τα μόρια του πολυμόρφου FVI διαλύονται γρηγορότερα στην αιθανόλη, καθιστώντας πιο άμεση τη μετατροπή του σε σταθερότερες μορφές, δηλαδή στην FII.
2. Λόγω χαμηλότερης διεπιφανειακής ενέργειας μεταξύ των μορφών, διευκολύνεται η αναδιάταξη των μορίων από το λιγότερο σταθερό πολυμορφισμό FVI στον πιο σταθερό FII.
3. Λόγω υψηλότερου προσθετικού παράγοντα, υπάρχει καλύτερη οργάνωση των μορίων προς δημιουργία σταθερών κρυσταλλικών μορφών. [117,123,124]



Στην Εικόνα 25 δίνονται φωτογραφίες της μορφολογίας των κρυστάλλων που σχηματίζουν τα πολύμορφα FII, FIII και FVI της Πιρακετάμης, όπως καταγράφηκαν μέσω ηλεκτρονικού μικροσκοπίου σάρωσης (SEM). [117]



Εικόνα 25: Κρύσταλλοι των πολυμόρφων FII, FIII και FVI της Πιρακετάμης, όπως καταγράφηκαν μέσω SEM. [117]

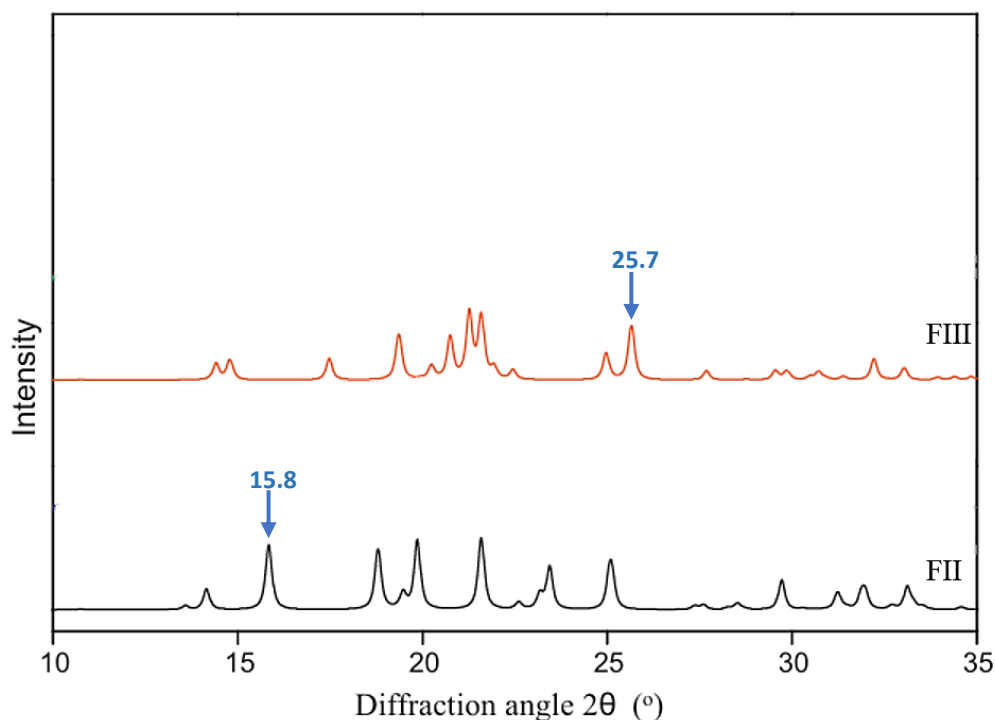
### 2.2.2 Ποιοτική ανάλυση των πολυμορφισμών της Πιρακετάμης μέσω XRD, IR και Raman

Υπάρχουν πολυάριθμες επιστημονικές μελέτες που εστιάζουν στη μελέτη και ανάλυση της Πιρακετάμης καθώς και των διαφόρων κρυσταλλικών της μορφών μέσω των τεχνικών της XRD, IR και Raman. Παρακάτω παρουσιάζονται βιβλιογραφικά και πειραματικά δεδομένα που έχουν προκύψει από την εφαρμογή των τριών αυτών τεχνικών.

#### *Εφαρμογή της XRD (XRPD)*

Δεδομένου ότι τα πολύμορφα διαφέρουν ως προς την κρυσταλλική τους δομή, η χρήση της περίθλασης ακτίνων X και ειδικότερα της XRPD έχει καθιερωθεί για τη μελέτη και ανάλυση του πολυμορφισμού. [125,126]

Στην Εικόνα 26 παρουσιάζονται τα περιθλασιογράμματα XRD, και συγκεκριμένα XRPD, των δύο βασικών πολυμόρφων FII και FIII της Πιρακετάμης, όπως καταγράφηκαν στη μελέτη των Croker et al. του 2012. Στην παρούσα μελέτη ως δείγμα προς ανάλυση χρησιμοποιήθηκαν μίγματα των πολυμόρφων FII και FIII. [127]



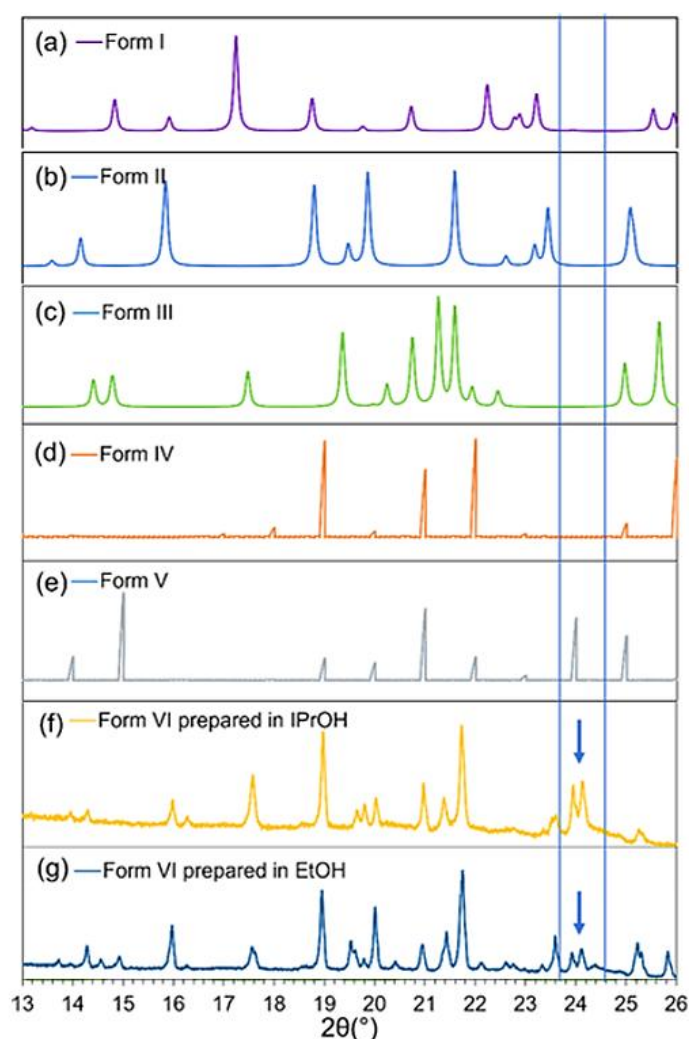
**Εικόνα 26:** Περιθλασιόγραμμα XRPD των δύο πολυμόρφων FII και FIII της Πιρακετάμης. Τα βέλη υποδεικνύουν δύο από τις χαρακτηριστικές κορυφές κάθε πολυμόρφου. [127]

Όπως γίνεται αντιληπτό παρατηρώντας τα δύο παραπάνω περιθλασιογράμματα, πρόκειται για δύο διαφορετικές ουσίες, στη συγκεκριμένη περίπτωση για δύο διαφορετικούς πολυμορφισμούς μιας ουσίας, καθώς παρουσιάζουν διαφορετικές κορυφές μεταξύ τους, αρκετές από τις οποίες δεν αλληλεπικαλύπτονται. Δύο τέτοιες χαρακτηριστικές κορυφές είναι εκείνη που εμφανίζεται στην τιμή  $2\theta = 15.8^\circ$  για το FII και στην  $2\theta = 25.7^\circ$  για το FIII, όπως υποδεικνύουν και τα αντίστοιχα βέλη στην Εικόνα 26.

Στην Εικόνα 27 παρουσιάζονται τα περιθλασιογράμματα όλων των πολυμόρφων της Πιρακετάμης, όπως αυτά παρουσιάζονται στην μελέτη των Kakkar et al., που δημοσιεύτηκε το 2022. Η μελέτη αυτή εισάγει το νέο πολύμορφο της Πιρακετάμης FVI, το οποίο όπως προαναφέρθηκε, θεωρείται μετασταθές και κρυσταλλώνεται σε θερμοκρασίες 283-298 K εντός αιθανόλης (EtOH) και ισοπροπανόλης (iPrOH).



Όπως διαπιστώνεται λοιπόν, τα περιθλασιογράμματα των πολυμόρφων FI-FV εμφανίζουν χαρακτηριστικές κορυφές, που τα καθιστούν διακριτά μεταξύ τους. Οι μοναδικές κορυφές που εντοπίζονται στα περιθλασιογράμματα της Εικόνας 26 είναι ομοίως παρούσες και στα φάσματα της Εικόνας 27. Ειδικότερα, στην περίπτωση του νέου πολυμόρφου FVI παρατηρείται μια μοναδική κορυφή, στην τιμή  $2\theta = 24.2^\circ$ , που το διαφοροποιεί από όλα τα υπόλοιπα γνωστά έως τώρα πολύμορφα της Πιρακετάμης. Καθίσταται λοιπόν σαφές ότι τα φάσματα που προκύπτουν από την XRD είναι σε θέση να παρέχουν σημαντικές πληροφορίες σχετικά με τη δομή των διαφορετικών πολυμόρφων της ουσίας. [117]

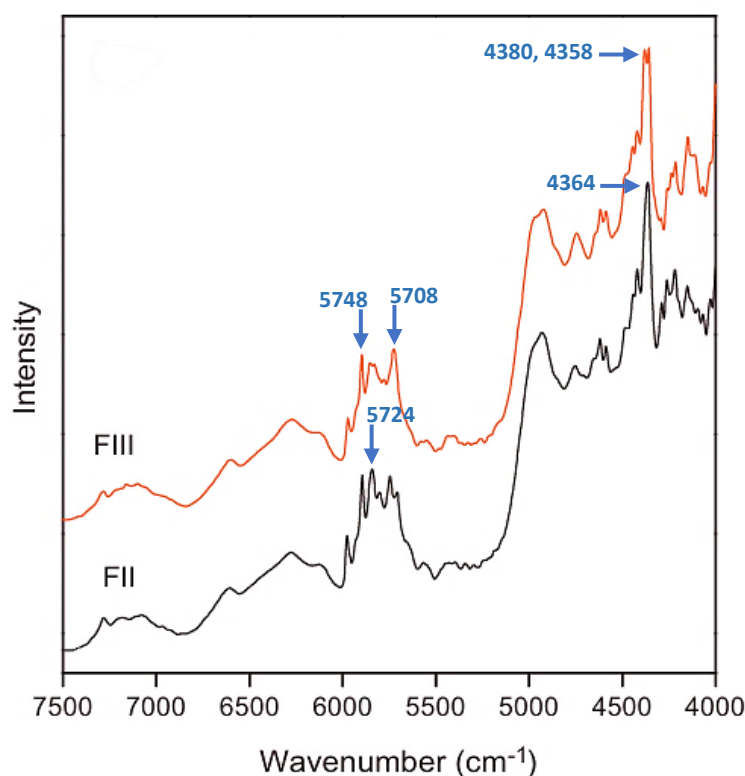


**Εικόνα 27:** Σύγκριση των περιθλασιογραμμάτων XRPD των πολυμόρφων FI (a) - FV (e) με εκείνα του πολυμόρφου FIV σε αιθανόλη (f) και ισοπροπανόλη (g). Τα βέλη υποδεικνύουν τις χαρακτηριστικές κορυφές που διακρίνουν την FVI από τις υπόλοιπες κρυσταλλικές μορφές. [117]

### Εφαρμογή της IR (NIR & MIR)

Η φασματομετρία υπέρυθρου, όπως για παράδειγμα η NIR (εγγύς υπέρυθρη) και η MIR (μέση υπέρυθρη), μπορεί να εφαρμοστεί για τον γρήγορο χαρακτηρισμό και την ποσοτικοποίηση πολυμόρφων φαρμακευτικών ουσιών. Η NIR σχετίζεται με τις υπερτονικές και συνδυασμένες δονητικές διεγέρσεις των βασικών μοριακών δονήσεων που εμφανίζονται στην περιοχή του εγγύς υπέρυθρου και είναι καταλληλότερη για ποσοτική ανάλυση, ενώ η MIR με τις θεμελιώδεις ταλαντώσεις που παρατηρούνται στην περιοχή του μέσου υπέρυθρου και υπερτερεί στην ποιοτική ανάλυση, όπως αναλύθηκε στον Πίνακα 6. [70,128]

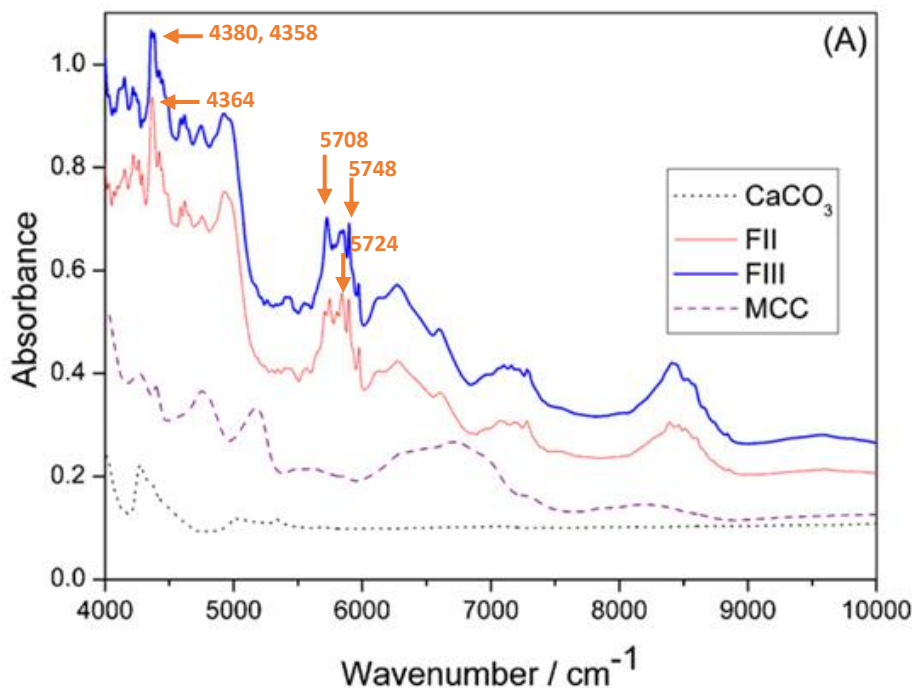
Στην Εικόνα 28 παρατίθεται φάσματα NIR των πολυμόρφων FII και FIII της Πιρακετάμης, όπως καταγράφηκαν στην ερευνητική μελέτη των Croker et al.



**Εικόνα 28:** Φάσματα NIR απορρόφησης των πολυμόρφων FII και FIII της Πιρακετάμης, όπως αυτά καταγράφηκαν από ανάλυση μιγμάτων FII-FIII. Τα βέλη υποδεικνύουν κάποιες από τις μοναδικές κορυφές κάθε πολυμόρφου. [127]

Στην εικόνα 29 παρουσιάζονται επίσης τα φάσματα NIR των πολυμόρφων FII και FIII, όπως αυτά παρουσιάζονται στην εργασία των Hennigan et al., η οποία δημοσιεύτηκε το 2013. Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκαν ως δείγματα επίσης μίγματα FII-FIII, όπως

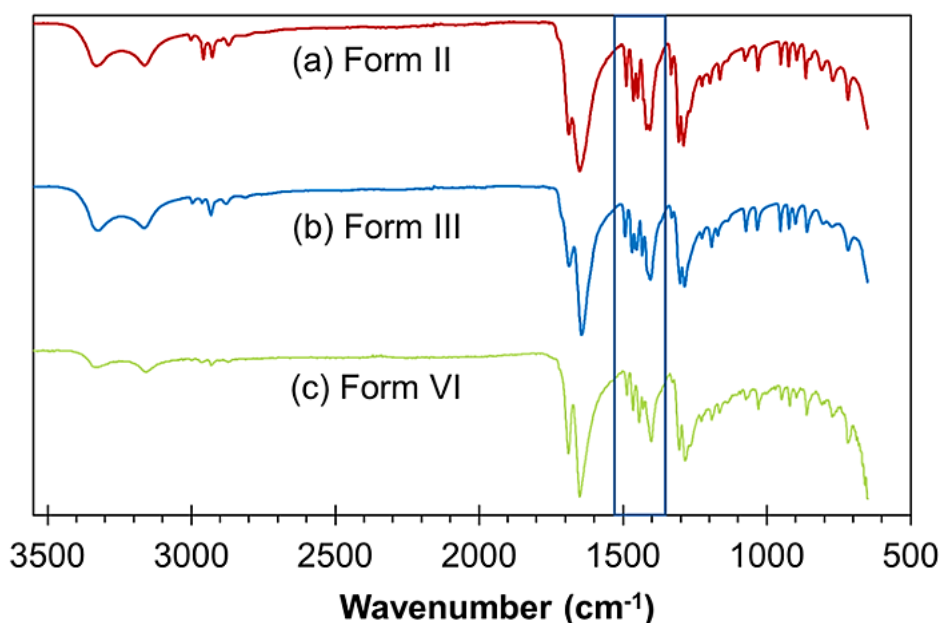
και σε εκείνη των Croker et al., και συγκεκριμένα δισκία (tablets) τα οποία περιείχαν επιπλέον ανθρακικό ασβέστιο ( $\text{CaCO}_3$ ) και μικροκρυσταλλική κυτταρίνη (Microcrystalline Cellulose-MCC).



**Εικόνα 29:** Φάσματα NIR απορρόφησης των πολυμόρφων FII και FIII της Πιρακετάμης, όπως αυτά καταγράφηκαν από ανάλυση μιγμάτων (δισκίων) FII-FIII. Τα βέλη υποδεικνύουν κάποιες από τις μοναδικές κορυφές κάθε πολυμόρφου. [66]

Με μία πρώτη ματιά καθίσταται δύσκολο να διακρίνουμε την κρυσταλλική μορφή FII από την FIII μέσω των παραπάνω φασμάτων NIR, καθώς οι κορυφές που έχουν προκύψει από την ανάλυση είναι σχετικά όμοιες. Παρατηρώντας καλύτερα, τα φάσματα των δύο πολυμόρφων παρουσιάζουν διαφορές στις φασματικές περιοχές 5870-5600 και 4314-4080  $\text{cm}^{-1}$ . Για παράδειγμα, η κρυσταλλική δομή FII εμφανίζει μία κορυφή στα 5724  $\text{cm}^{-1}$ , ενώ η FIII έχει δύο κορυφές στα 5748 και 5708  $\text{cm}^{-1}$ . Επιπλέον, η FII έχει μία κορυφή στα 4364  $\text{cm}^{-1}$ , ενώ η FIII δύο κορυφές στα 4380 και 4358  $\text{cm}^{-1}$ . [66,127]

Στην Εικόνα 30 παρουσιάζεται το φάσμα IR, και συγκεκριμένα ATR FTIR του νέου πολυμόρφου FVI που μελετήθηκε από τους Kakkar et al., σε σύγκριση με εκείνα των FII και FIII.



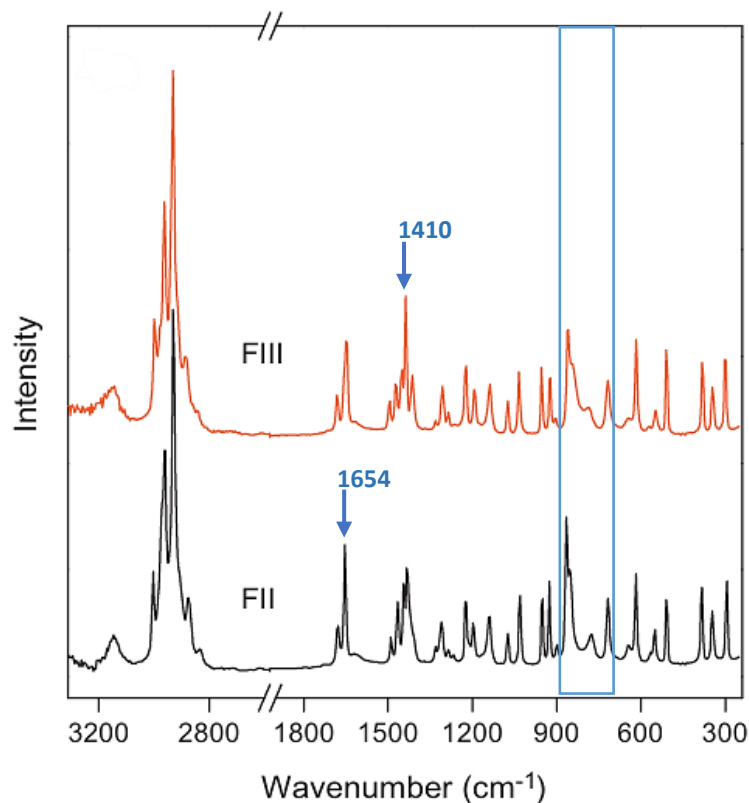
**Εικόνα 30:** Φάσματα ATR FTIR διαπερατότητας των πολυμόρφων FII (a), FIII (b) και FVI (c). Με κάθετες γραμμές οριοθετείται η περιοχή όπου αναμένονται διαφορές στις μοναδικές κορυφές μεταξύ των πολυμόρφων. [117]

Όπως και στις Εικόνες 28 και 29, τα φάσματα IR των πολυμόρφων FII και FIII παρουσιάζουν πολύ μικρές διαφορές μεταξύ τους με αποτέλεσμα να καθίσταται δύσκολη η διάκριση του ενός πολυμόρφου από το άλλο με απλή παρατήρηση. Όσον αφορά το φάσμα του νέου πολυμόρφου FVI παρατηρούνται μικρές διαφορές που το ξεχωρίζουν από εκείνα των άλλων δύο πολυμόρφων. Οι διαφορές αυτές εντοπίζονται κυρίως στην περιοχή 1400-1500  $\text{cm}^{-1}$ , όπως φαίνεται και παραπάνω.

### **Εφαρμογή της Raman (BR & TRS)**

Στη φασματοσκοπία Raman ο γενικός κανόνας είναι ότι για να πραγματοποιηθεί μια ενεργή δόνηση πρέπει να υπάρχει αλλαγή στην πολωσιμότητα (polarizability) του μορίου κατά τη διάρκεια της μοριακής του δόνησης. Δεδομένου ότι πολλές δραστικές φαρμακευτικές ουσίες (APIs) περιέχουν ενεργές αρωματικές ομάδες, οι οποίες μπορούν να διατηρήσουν τη συμμετρία τους κατά τη διάρκεια μοριακών δονήσεων, θεωρείται πως εμφανίζουν ισχυρή σκέδαση Raman. Επιπλέον, οι πολυμορφισμοί της ίδιας ουσίας παρουσιάζουν διακριτές διατάξεις των ατόμων ή μορίων τους, και επομένως τα φάσματα Raman των πολυμόρφων θα διαφέρουν λόγω μικρών διαφορών στις μοριακές δονήσεις και περιστροφές τους. [127,129]

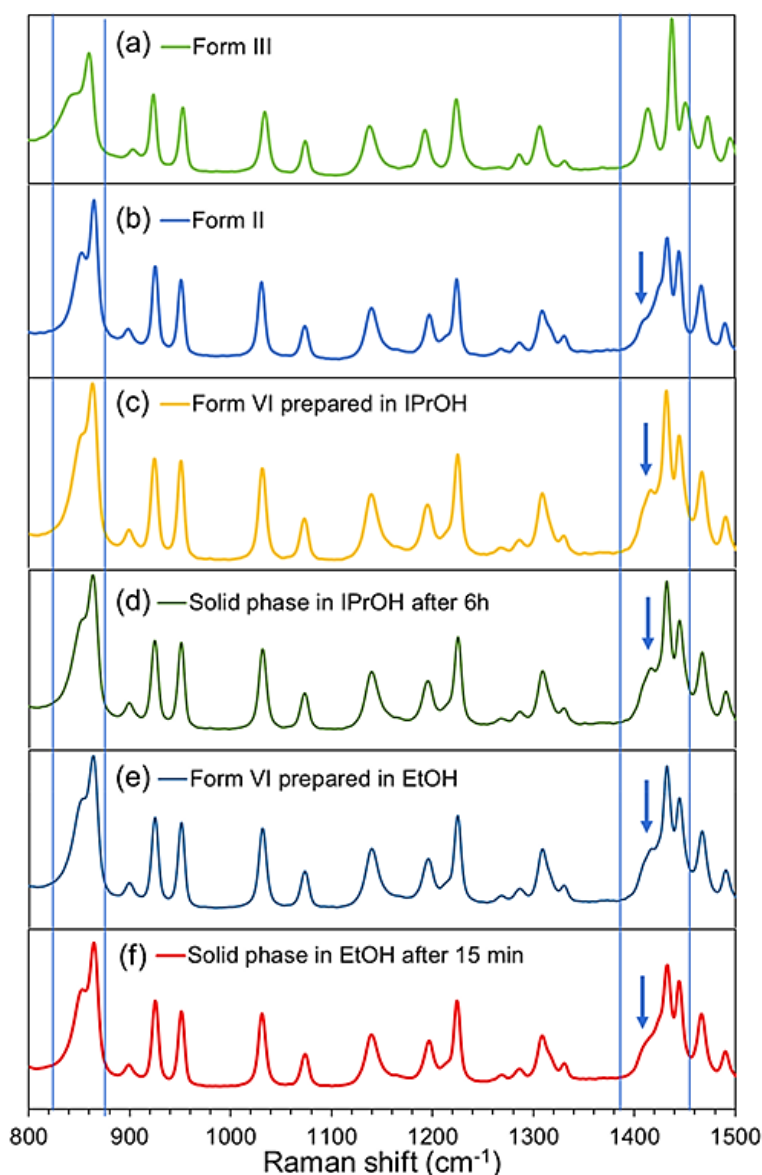
Στην Εικόνα 31 φαίνονται τα φάσματα Raman των πολυμόρφων FII και FIII όπως αυτά καταγράφηκαν στην έρευνα των Croker et al.



**Εικόνα 31: Φάσματα Raman των πολυμορφισμών FII και FIII της Πιρακετάμης, όπως αυτά καταγράφηκαν από ανάλυση μινιμάτων FII-FIII. Τα βέλη, καθώς και η οριοθετημένη περιοχή υποδεικνύουν κάποιες από τις χαρακτηριστικές κορυφές κάθε πολυμόρφου. [127]**

Όπως παρατηρήθηκε και στην IR, τα φάσματα των δύο πολυμόρφων (FII και FIII) είναι αρκετά παρόμοια. Ωστόσο, μπορούν να εντοπιστούν μικρές διαφορές που συμβάλουν στη διάκριση των δύο κρυσταλλικών μορφών. Πιο συγκεκριμένα, η μορφή FII διαθέτει μία έντονη χαρακτηριστική κορυφή στα  $1654\text{ cm}^{-1}$ , ενώ η FIII μία στα  $1410\text{ cm}^{-1}$ . Μικρές διαφορές μεταξύ των δύο μορφών παρατηρούνται επίσης στην περιοχή των  $890\text{--}750\text{ cm}^{-1}$ , οι οποίες σχετίζονται με αλλαγές στα μήκη και τις γωνίες των δεσμών που σχηματίζονται από τα άτομα που βρίσκονται κοντά στην καρβονυλομάδα ( $\text{C=O}$ ). [127]

Παρακάτω στην Εικόνα 32 δίνονται τα φάσματα Raman των πολυμόρφων FII, FIII και του νέου πολυμόρφου FVI, όπως μελετήθηκαν στην έρευνα των Kakkar et al.

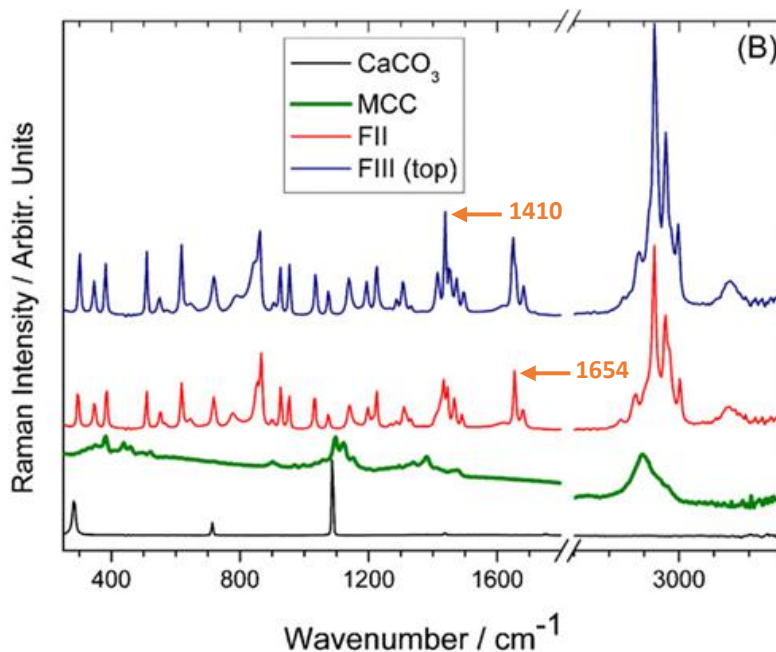


Εικόνα 32: Φάσματα Raman των πολυμόρφων FII (b), FIII (a) και FVI σε iPrOH (c) και EtOH (e). Στα σχήματα (d) και (f) δίνονται τα φάσματα της FVI σε iPrOH και EtOH μετά από 6h και 15 min αντίστοιχα. Τα βέλη υποδεικνύουν τη χαρακτηριστική κορυφή Raman που ξεχωρίζει την FVI από τους υπόλοιπους πολυμορφισμούς. [117]

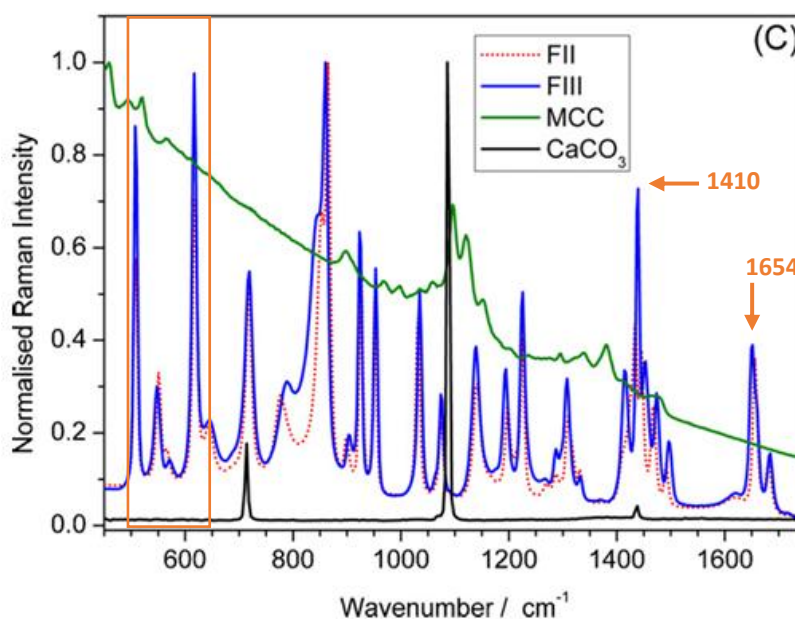
Κοιτώντας τα φάσματα (a), (b) και (c) της Εικόνας 31 παρατηρούμε πως η FIII διαθέτει μία χαρακτηριστική κορυφή περίπου στα  $1410\text{ cm}^{-1}$ , όπως ακριβώς και στην Εικόνα 30, η οποία την ξεχωρίζει από την FII. Η FVI διαθέτει μία πολύ μικρή κορυφή, περίπου στα ίδια  $\text{cm}^{-1}$ , παρουσιάζοντας μεγαλύτερη ομοιότητα με εκείνη της FII. Η ομοιότητα αυτή γίνεται εντονότερη μετά το πέρας των 15 λεπτών για την FVI εντός αιθανόλης, οπότε και η κρυσταλλική μορφή της παύει να διατηρείται και το πολύμορφο μετατρέπεται ξανά στην μορφή FII. [117]



Αντίθετα, στις Εικόνες 33 και 34 παρουσιάζονται τα φάσματα Raman των πολυμόρφων FII και FIII, μέσω των μεθοδολογιών Backscattering (BR) και Transmission (TRS), όπως αυτά καταγράφηκαν στην επιστημονική μελέτη των Hennigan et al. σε δισκία Πιρακετάμης.



Εικόνα 33: Φάσματα Backscattering Raman των πολυμόρφων FII και FIII της Πιρακετάμης, όπως αυτά καταγράφηκαν από την ανάλυση μιγμάτων (δισκίων) FII-FIII. Τα βέλη, υποδεικνύουν κάποιες από τις χαρακτηριστικές κορυφές κάθε πολυμόρφου. [66]



Εικόνα 34: Φάσματα Transmission Raman των πολυμόρφων FII και FIII της Πιρακετάμης, όπως αυτά καταγράφηκαν από την ανάλυση μιγμάτων (δισκίων) FII-FIII. Τα βέλη και η οριοθετημένη περιοχή, υποδεικνύουν κάποιες από τις χαρακτηριστικές κορυφές κάθε πολυμόρφου. [66]

Όπως παρατηρούμε, τα φάσματα της Εικόνας 33 είναι παρόμοια με εκείνα της Εικόνας 32. Ωστόσο, στην Εικόνα 34 η Transmission Raman παρέχει πιο αναλυτική πληροφορία για το εύρος 450-1750  $\text{cm}^{-1}$ , δίνοντας την δυνατότητα να εντοπίσουμε επιπλέον κορυφές οι οποίες διαφέρουν μεταξύ των δύο πολυμόρφων, όπως για παράδειγμα εκείνες στην περιοχή 500-650  $\text{cm}^{-1}$ .

### **2.2.3 Ποσοτική ανάλυση των πολυμορφισμών της Πιρακετάμης μέσω XRD, IR και Raman**

Η ποσοτική ανάλυση σε συνδυασμό με την ταυτοποίηση πολυμορφισμών έχει καταστεί απαραίτητη προϋπόθεση στην παραγωγή και τον ποιοτικό έλεγχο φαρμακευτικών σκευασμάτων, καθώς ο έλεγχος για την ύπαρξη προσμίξεων από άλλα πολύμορφα της δραστικής ουσίας ενός φαρμάκου είναι κρίσιμος για την ποιότητα και τη διασφάλιση των ιδιοτήτων του. [125,130]

Η ποσοτικοποίηση χρησιμοποιώντας XRPD βασίζεται στην αρχή ότι η ένταση της κορυφής περίθλασης για ένα συστατικό σε ένα μίγμα σχετίζεται με τη συγκέντρωση αυτού του συστατικού στο μίγμα. Διάφορες παράμετροι μιας κορυφής μπορούν να χρησιμοποιηθούν για αυτήν την ανάλυση, όπως είναι η ένταση του ύψους της κορυφής (peak height intensity), η αναλογία της έντασης ύψους της κορυφής (ratio of peak height intensity) και η περιοχή της κορυφής (peak area), οι οποίες είναι οι πιο κοινές στη μονομεταβλητή ανάλυση. Τα φαρμακευτικά συστατικά συχνά εμφανίζουν υψηλό βαθμό προτιμώμενου προσανατολισμού, γεγονός που μπορεί να δυσχεράνει την απόκτηση καλών, αντιπροσωπευτικών και αναπαραγωγικών περιθλασιογραμάτων και την επακόλουθη ποσοτική ανάλυση. Ομοίως, στις τεχνικές IR και Raman οι εντάσεις των κορυφών μπορούν να χρησιμοποιούνται για ποσοτική ανάλυση, καθώς είναι ανάλογες της συγκέντρωσης της προς μελέτη ουσίας σε ένα μίγμα. [131-137]

Στην μελέτη των Croker et al., πραγματοποιήθηκε πειραματικός ποσοτικός προσδιορισμός της συγκέντρωσης του πολυμόρφου FII σε μίγματα FII-FIII μέσω των τεχνικών XRPD, Backscattering Raman και NIR με σκοπό την αξιολόγηση της ικανότητας και ακρίβειας κάθε τεχνικής στη διάκριση των δύο παραπάνω πολυμόρφων.

Έτσι, λήφθηκαν αρχικά τα φάσματα που παρουσιάστηκαν στις Εικόνες 26, 28 και 31 και ακολούθως επιλέχθηκαν μοναδικές κορυφές για κάθε πολύμορφο από τα φάσματα των



τριών τεχνικών. Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε ποσοτική ανάλυση χρησιμοποιώντας πρότυπα μίγματα FII-FIII γνωστής περιεκτικότητας FII, με σκοπό τη δημιουργία καμπύλης βαθμονόμησης. Για την ποσοτική ανάλυση χρησιμοποιήθηκε η ανάλυση παλινδρόμησης μερικών ελαχίστων τετραγώνων (PLS), μία στατιστική μέθοδος που χρησιμοποιείται για τη μοντελοποίηση των σχέσεων μεταξύ εξαρτημένων και ανεξάρτητων μεταβλητών, η οποία αποδίδει ακριβή αποτελέσματα.

Στους Πίνακες 8 και 9 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της ποσοτικής ανάλυσης του πολυμόρφου FII εντός του μίγματος των FII και FIII, καθώς και τα όρια ανίχνευσης LOD και ποσοτικοποίησης LOQ που υπολογίστηκαν. Πιο αναλυτικά, στον Πίνακα 8 παρατίθεται η πειραματικά προσδιοριζόμενη % περιεκτικότητα της κρυσταλλικής μορφής FII σε 4 διαφορετικά μίγματα των πολυμόρφων FII και FIII που υπολογίστηκε με τη χρήση PLS. Στον Πίνακα 9 παρατίθενται οι τιμές  $R^2$  των γραμμικών εξισώσεων (καμπυλών βαθμονόμησης) που προέκυψαν από τα πειραματικά δεδομένα, καθώς και οι παράγοντες  $RMSEC\%$  (σφάλμα πρόβλεψης κατά τη βαθμονόμηση) και  $RMSEP\%$  (σφάλμα πρόβλεψης κατά την εφαρμογή του μοντέλου). Οι δύο αυτοί παράγοντες αποτελούν στατιστικές παραμέτρους για την αξιολόγηση ακρίβειας και απόδοσης του μοντέλου που χρησιμοποιήθηκε για την στατιστική ανάλυση. Όσο μικρότερες είναι οι τιμές των δύο αυτών παραμέτρων, τόσο αποδοτικότερη είναι η τεχνική για ποσοτικοποίηση.

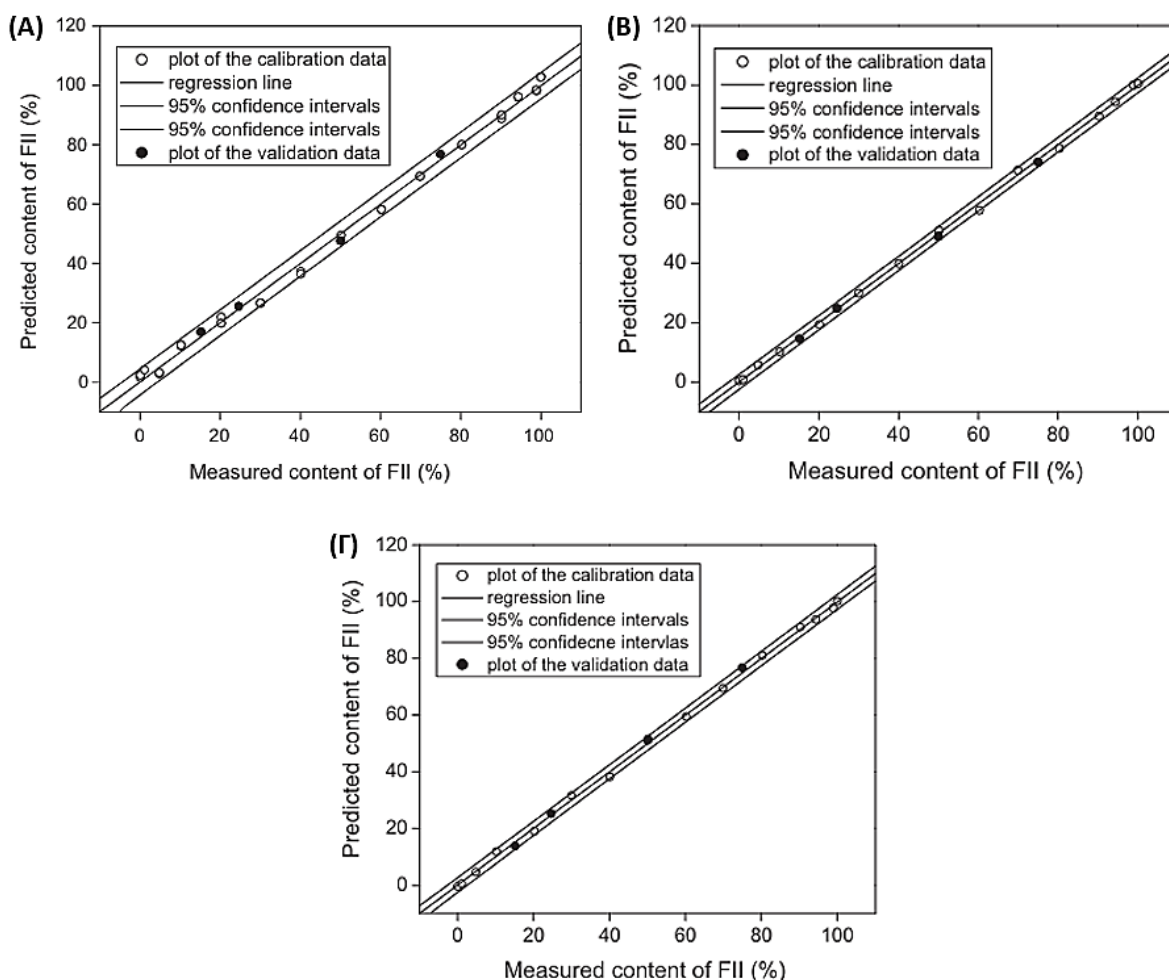
Περιεκτικότητα σε FII (%)	XRPD (PLS)	Raman (PLS)	NIR (PLS)
15.12	16.95	14.53	14.59
24.58	25.57	25.10	24.79
49.95	47.69	51.26	49.14
74.95	76.86	76.59	74.13
<b>LOD</b>	0.75	1.48	0.84
<b>LOQ</b>	2.26	4.47	2.56

Πίνακας 8: Σύγκριση της ικανότητας ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης της FII σε μίγματα FII-FIII ανάμεσα στις τρεις τεχνικές. [127]

Μέθοδος	R <sup>2</sup>	PLS factor	RMSEC (%)	RMSEP (%)
XRPD (PLS)	0.997	1	2.07	1.81
Raman (PLS)	0.999	1	0.94	1.21
NIR (PLS)	0.999	1	0.99	0.64

**Πίνακας 9:** Σύγκριση των τιμών R<sup>2</sup>, RMSEC% και RMSEP% των τριών τεχνικών για την ποσοτικοποίηση της μορφής FII σε μίγματα FII-FIII. [127]

Στην Εικόνα 35 παρουσιάζονται οι καμπύλες συσχέτισης μεταξύ της αναμενόμενης και της πειραματικά προσδιοριζόμενης περιεκτικότητας του πολυμόρφου FII στα μίγματα, για τις τεχνικές XRPD (Α), NIR (Β) και BR (Γ) με τη χρήση PLS. Όπως παρατηρούμε, τα διαστήματα εμπιστοσύνης 95% για τις τεχνικές NIR (Β) και Raman (Γ) είναι πολύ στενότερα από εκείνα της XRPD (Α).



**Εικόνα 35:** Καμπύλη Συσχέτισης της αναμενόμενης (predicted) και υπολογισμένης (measured) περιεκτικότητας της μορφής FII σε μίγματα FII-FIII των τεχνικών (Α) XRPD, (Β) NIR και (Γ) Raman, με τη χρήση PLS. [127]

Στη μελέτη των Hennigan et al. του 2013, πραγματοποιήθηκε επίσης ποσοτική ανάλυση του πολυμόρφου FII σε δισκία που περιείχαν τα πολύμορφα FII και FIII της Πιρακετάμης μέσω των τεχνικών NIR και Raman. Όπως και στη μελέτη των Croker et al., χρησιμοποιήθηκε η ίδια ποσοτική ανάλυση με PLS. Ωστόσο, στη συγκεκριμένη μελέτη αξιοποιήθηκαν και οι δύο μεθοδολογίες της Raman, η Backscattering και η Transmission Raman. Οι τιμές των *RMSEC%* και *RMSEP%* που προσδιορίστηκαν για κάθε τεχνική παρουσιάζονται στον Πίνακα 10, ενώ στον Πίνακα 11 παρουσιάζονται τα όρια ανίχνευσης που προσδιορίστηκαν για τις τεχνικές NIR και TRS Raman. [66]

Μέθοδος	R <sup>2</sup>	RMSEC (%)	RMSEP (%)
NIR	0.995	0.44	0.94
Raman (BR)	0.969	1.03	2.62
Raman (TRS)	0.997	0.33	0.44

**Πίνακας 10:** Σύγκριση των τιμών R<sup>2</sup>, RMSEC% και RMSEP% των NIR, BR και TRS σχετικά με την ποσοτικοποίηση της μορφής FII σε δισκία FII-FIII. [66]

Μέθοδος	LOD
NIR	0.7 %
Raman (TRS)	0.6 %

**Πίνακας 11:** Σύγκριση των ορίων ανίχνευσης (LOD) των NIR και TRS σχετικά με την ποσοτικοποίηση της μορφής FII σε δισκία FII-FIII. [66]

## 2.2.4 Σύγκριση των τριών τεχνικών

Στις τρεις προηγούμενες υποενότητες παρατέθηκαν τα αποτελέσματα της ποιοτικής και της ποσοτικής ανάλυσης των πολυμόρφων της Πιρακετάμης, δίνοντας έμφαση στις κρυσταλλικές μορφές FII, FIII και FVI. Το πολύμορφο FIII αποτελεί τη θερμοδυναμικά σταθερή κρυσταλλική μορφή της Πιρακετάμης σε συνθήκες RT, ενώ η μορφή FII είναι μία μετασταθής μορφή στις ίδιες συνθήκες. Αντιθέτως, η FVI είναι μία μετασταθής μορφή που κρυσταλλώνεται σε θερμοκρασίες 283-298 K εντός ισοπροπανόλης και αιθανόλης και διατηρείται για μερικές ώρες και μερικά λεπτά αντίστοιχα. Μετά το πέρας των χρονικών αυτών διαστημάτων η FVI μετατρέπεται στη μορφή FII. [110-114,117]

Η ποιοτική ανάλυση των παραπάνω πολυμόρφων μέσω των τεχνικών XRD, IR και Raman απέδειξε πως και οι τρεις τεχνικές είναι ικανές να αναγνωρίζουν τα παραπάνω πολύμορφα. Ωστόσο, παρουσιάζουν διαφορές μεταξύ τους, οι οποίες τις καθιστούν περισσότερο ή λιγότερο κατάλληλες ανάλογα τις συνθήκες.

Γενικά, η XRD είναι βασική τεχνική για την αναγνώριση και τον χαρακτηρισμό διαφορετικών κρυσταλλικών μορφών μίας ουσίας, καθώς παρέχει μοναδικά φάσματα περίθλασης για κάθε πολύμορφο, τα οποία λειτουργούν ως αποτύπωμα και επιτρέπουν την ακριβή αναγνώριση και διάκριση κρυσταλλικών δομών. Είναι ιδιαίτερα αποτελεσματική στην καθοριστική ανάλυση της κρυσταλλικής διάταξης στερεών και στην ανίχνευση πολλαπλών πολυμόρφων σε ένα δείγμα. Ωστόσο, αποτελεί μία χρονοβόρα τεχνική, η οποία συχνά απαιτεί μεγάλη προετοιμασία δείγματος. Ακόμη, ένα σημαντικό μειονέκτημα της XRD είναι η ευαισθησία της σε φαινόμενα όπως ο προτιμώμενος προσανατολισμός (preferred orientation), δηλαδή η τάση των κρυστάλλων ενός δείγματος να τοποθετούνται με συγκεκριμένη κατεύθυνση, κάτι που μπορεί να οδηγήσει στη λήψη μη αντιπροσωπευτικών αποτελεσμάτων κατά την ανάλυση. Όπως παρατηρήσαμε στις προηγούμενες εικόνες, η ανάλυση XRD των πολυμόρφων FII, FIII αλλά και FVI παρείχε διακριτά περιθλασιογράμματα, με εμφανείς διαφορές τις οποίες μπορέσαμε να εντοπίσουμε με μία απλή ματιά. [66,130-132]

Η φασματοσκοπία Raman αποτελεί μια επίσης χρήσιμη, μη καταστροφική τεχνική για τον χαρακτηρισμό και τη διάκριση πολυμορφισμών, η οποία απαιτεί ελάχιστη έως μηδενική προετοιμασία δείγματος και παρέχει κυρίως πληροφορίες για τις μοριακές δονήσεις και τις λειτουργικές ομάδες. Το διακριτό φάσμα δόνησης κάθε πολυμόρφου μπορεί να αποκαλύψει διαφορές στις μοριακές διατάξεις, καθιστώντας την συχνά συμπληρωματική τεχνική της XRD. Ένα βασικό μειονέκτημα της τεχνικής Raman αποτελεί ο φθορισμός που μπορεί να παρατηρηθεί κατά την ανάλυση ορισμένων δειγμάτων, ειδικότερα στην περίπτωση όπου χρησιμοποιείται η μεθοδολογία της BR, ο οποίος πιθανόν να επισκιάσει σημαντικές φασματικές πληροφορίες στα αποτελέσματα. Τέτοια προβλήματα, μπορούν να μειωθούν σημαντικά με τη χρήση της Transmission Raman, η οποία αποδίδει πιο έγκυρα αποτελέσματα λόγω της μεγαλύτερης διεύθυνσης εντός του δείγματος. [66,127,138,139]

Ομοίως, η φασματοσκοπία IR αναγνωρίζει τις μοριακές δονήσεις και τις λειτουργικές ομάδες, αλλά γενικά είναι λιγότερο αποτελεσματική από την XRD για μελέτες πολυμορφισμού. Η μέθοδος IR μπορεί να δυσκολεύεται να διακρίνει πολύμορφα που έχουν

παρόμοιες διατάξεις λειτουργικών ομάδων, καθιστώντας την λιγότερο συγκεκριμένη σε σύγκριση με τις άλλες δύο μεθόδους. Μεταξύ των τεχνικών NIR και MIR, που αναλύθηκαν, η δεύτερη κρίνεται ως καταλληλότερη τεχνική για ποιοτική ανάλυση, καθώς οι απορροφήσεις της MIR σχετίζονται πιο άμεσα με τη χημική σύσταση (δεσμοί και λειτουργικές ομάδες) του δείγματος. [66,85,127,138,139]

Τα παραπάνω επιβεβαιώνονται και από τα φάσματα IR και Raman που λήφθηκαν για τα πολύμορφα FII, FIII αλλά και FVI της Πιρακετάμης, καθώς οι διακριτές κορυφές, παρόλο που υπήρχαν, εντοπίζονταν με μεγαλύτερη δυσκολία από ότι στα φάσματα της XRD.

Όσον αφορά την ποσοτική ανάλυση, η ποσοτικοποίηση της κρυσταλλικής μορφής FII σε μείγματα με το πολύμορφο FIII αποδείχθηκε εξίσου εφικτή είτε μέσω της τεχνικής XRPD είτε μέσω των NIR και Raman. Ωστόσο, οι δύο τελευταίες φαίνεται πως υπερτερούν της XRPD. Αυτό είναι εμφανές από τα αποτελέσματα της ποσοτικής ανάλυσης των Croker et al., που παρουσιάζονται στον Πίνακα 8, καθώς συγκρίνοντας τις πραγματικές τιμές της περιεκτικότητας της FII στα μίγματα FII-FIII με αυτές που υπολογίστηκαν χρησιμοποιώντας τις τρεις τεχνικές, οι NIR και Raman (BR) κρίνονται ως οι πιο ακριβείς μέθοδοι, ακολουθούμενες από την XRPD. Ακόμη, συγκρίνοντας τα διαστήματα εμπιστοσύνης 95% της Εικόνας 35, εκείνα των Raman και NIR είναι στενότερα από εκείνα της XRPD, κάτι που μεταφράζεται σε μεγαλύτερη ακρίβεια και μικρότερη αβεβαιότητα των αποτελεσμάτων των δύο τεχνικών. Επίσης, οι τιμές  $RMSEC\%$  και  $RMSEP\%$  που δίνονται στον Πίνακα 9 για τα μοντέλα Raman και NIR είναι σημαντικά μικρότερες από εκείνες του μοντέλου XRPD. [127]

Αντιθέτως, παρατηρούμε ότι οι τιμές των ορίων LOD και LOQ της τεχνικής XRPD στον Πίνακα 8 είναι χαμηλότερες, ενώ ακολουθούν εκείνες της NIR και της Raman. Αυτό οφείλεται στο γεγονός πως κατά την ανάλυση των δειγμάτων με την τεχνική της XRPD παρατηρήθηκε έντονα το φαινόμενο του προτιμώμενου προσανατολισμού (preferred orientation), το οποίο επηρέασε σημαντικά τα αποτελέσματα καθιστώντας τα μη αντιπροσωπευτικά. Οι τεχνικές Raman και NIR, αν και παρουσιάζουν ελαφρώς υψηλότερα LOD και LOQ, δεν επηρεάστηκαν από τέτοια προβλήματα κατά την ανάλυση και παρείχαν πιο αξιόπιστα αποτελέσματα στην ποσοτικοποίηση των πολυμορφικών μιγμάτων της Πιρακετάμης. [127]

Όπως συμβαίνει και στη μελέτη των Croker et al., έτσι και σε εκείνη των Hennigan et al. μεταξύ της κλασσικής μεθοδολογίας Raman (BR) και της NIR, η δεύτερη κρίνεται πιο ικανή σχετικά με την ποσοτικοποίηση του πολυμόρφου FII στα μίγματα FII-FIII, όπως φαίνεται στον Πίνακα 10. Ωστόσο, παρατηρούμε ότι η TRS εμφανίζει σημαντικά μικρότερες τιμές  $RMSEC\%$  και  $RMSEP\%$ , καθώς και μεγαλύτερη τιμή συντελεστή γραμμικότητας  $R^2$ . Ακόμη, όπως φαίνεται στον Πίνακα 11, τα όρια ανίχνευσης (LOD) υπολογίστηκαν περίπου 0.7% για την NIR και 0.6% για την TRS. [66]

Συνοψίζοντας όλα τα παραπάνω, η NIR φαίνεται να δίνει πιο ακριβείς προβλέψεις περιεκτικότητας σχετικά με την XRPD και την backscattering Raman, όμως η Transmission Raman κρίνεται ως ικανότερη τεχνική ποσοτικοποίησης μεταξύ όλων των προαναφερθέντων. [66,127]

## 2.2.5 Συμπεράσματα

Εν κατακλείδι, η περίθλαση ακτίνων X (XRD) αποτελεί την ιδανική τεχνική για τη γρήγορη ταυτοποίηση πολυμόρφων, καθώς παρέχει απλά φάσματα με διακριτές και μοναδικές κορυφές για κάθε κρυσταλλική μορφή. Ωστόσο, όταν απαιτείται η ποσοτικοποίηση των αποτελεσμάτων, οι τεχνικές IR και Raman κρίνονται καταλληλότερες παρέχοντας ακριβέστερα αποτελέσματα σε σχέση με την XRD.

Από τις μελέτες που αναλύθηκαν στις προηγούμενες παραγράφους εξάγεται το συμπέρασμα πως η τεχνική της NIR επικρατεί έναντι της BR (backscattering Raman), έχοντας την ικανότητα να ανιχνεύει και να ποσοτικοποιεί με μεγαλύτερη ακρίβεια μία κρυσταλλική μορφή μίας ουσίας σε μίγμα πολυμόρφων. Παρόλα αυτά, η μελέτη των Hennigan et al., απέδειξε πως η μεθοδολογία της Raman διαπερατότητας (TRS) προσφέρει μεγαλύτερη ακρίβεια στην ποσοτικοποίηση, καθώς και χαμηλότερα όρια ανίχνευσης από την NIR. Επιπλέον, πρόκειται για μια αρκετά ταχύτερη τεχνική, η οποία ειδικά για την ανάλυση των πολυμορφισμών της Πιρακετάμης χρειάστηκε 6 δευτερόλεπτα ανά δείγμα, συγκριτικά με τη NIR που χρειάστηκε 2.5-3 λεπτά. [66]

Αναζητώντας περαιτέρω στη βιβλιογραφία, η τεχνική της Raman διαπερατότητας αναδεικνύεται ως καταλληλότερη τεχνική για διάκριση και ποσοτικοποίηση πολυμορφισμών συγκριτικά με τις NIR και BR, καθώς παρουσιάζει μεγαλύτερη ευαισθησία στις παραλλαγές της κρυσταλλικής δομής, είναι γρηγορότερη, μη καταστρεπτική,

επηρεάζεται λιγότερο από τον φθορισμό του δείγματος και διαθέτει την ικανότητα λήψης πληροφορίας από τον συνολικό όγκο του δείγματος. Επίσης, η Raman διαθέτει το πλεονέκτημα πως συχνά απαιτεί ελάχιστη προετοιμασία δείγματος, μειώνοντας τον κίνδυνο μετατροπής ή και καταστροφής του δείγματος κατά τον χειρισμό. Ωστόσο, πρόκειται για μία ακριβή τεχνική, της οποίας η οργανολογία χαρακτηρίζεται από υψηλό κόστος λόγω της απαίτησης ισχυρών πηγών laser και ευαίσθητων ανιχνευτών. [140,141]

Κάθε μία από τις τεχνικές που μελετήθηκαν στην παρούσα εργασία διαθέτει μοναδικά χαρακτηριστικά, πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα. Η καταλληλότητά τους εξαρτάται από τις συνθήκες και τις απαιτήσεις της εκάστοτε ανάλυσης. Αν και η ανίχνευση και η ποσοτικοποίηση πολυμορφισμών σε μίγματα είναι εφικτή χρησιμοποιώντας μία μόνο τεχνική, στις περισσότερες περιπτώσεις προτείνεται ο συνδυασμός διαφορετικών τεχνικών. Αυτό συμβαίνει γιατί ορισμένες μέθοδοι είναι πιο κατάλληλες για την ανίχνευση, ενώ άλλες προσφέρουν μεγαλύτερη ακρίβεια στην ποσοτικοποίηση. Επιπλέον, τα αποτελέσματα κάθε τεχνικής μπορεί να επηρεαστούν από διάφορους παράγοντες, γεγονός που καθιστά χρήσιμη τη διασταύρωση των δεδομένων από διαφορετικές προσεγγίσεις. Ο συνδυασμός τεχνικών ενισχύει την ακρίβεια και την αξιοπιστία των αποτελεσμάτων, επιβεβαιώνοντας την εγκυρότητά τους και διευκολύνοντας την υπέρβαση προβλημάτων όπως ο θόρυβος ή οι παρεμβολές που μπορεί να προκύψουν κατά τη διαδικασία ανάλυσης. [142,143]



## Βιβλιογραφία

1. Golan, D. E., Tashjian, A. H., Armstrong, E. J., & Armstrong, A. W. (2012). Principles of Pharmacology: The Pathophysiologic Basis of Drug Therapy (3rd ed.). Lippincott Williams & Wilkins.
2. Waller, D., Renwick, A., & Hillier, K. (2006). Medical Pharmacology and Therapeutics (2nd ed.). Elsevier.
3. Kumar, V., Bansal, V., Madhavan, A., Kumar, M., Sindhu, R., Awasthi, M. K. & Saran, S. (2022). Active pharmaceutical ingredient (API) chemicals: A critical review of current biotechnological approaches. Bioengineered, 13(2), 4309–4327.
4. Abrantes, C. G., Duarte, D., & Reis, C. P. (2016). An overview of pharmaceutical excipients: Safe or not safe? Journal of Pharmaceutical Sciences, 105(7), 2019-2026.
5. Ternes, T. A., & Joss, A. (2006). Human Pharmaceuticals, Hormones and Fragrances-The Challenge of Micropollutants in Urban Water Management. IWA Publishing.
6. Kümmerer, K. (2004). Pharmaceuticals in the Environment: Sources, Fate, Effects and Risks. Springer.
7. Kumar, A., Bisht, B. S., Joshi, V. D., et al. (2010). Physical, chemical and bacteriological study of water from rivers of Uttarakhand. Journal of Human Ecology, 32(3), 169–173.
8. Vijay, G. (2017). Systemic failure of regulation: The political economy of pharmaceutical and bulk drug manufacturing. In The Politics of the Pharmaceutical Industry and Access to Medicines: World Pharmacy and India. Social Science Press.
9. Shargel, L. (Ed.). (2004). Generic Drug Product Development: Solid Oral Dosage Forms (1st ed.). CRC Press.
10. Gibaldi, M., & Perrier, D. (Eds.). (1982). Pharmacokinetics (2nd ed.). CRC Press.
11. Willig, S. H., Tuckerman, M. M., & Hitchings IV, W. S. Good Manufacturing Practices for Pharmaceuticals: A Plan for Total Quality Control.
12. World Health Organization (n.d.). Generic Drugs. Ανακτήθηκε από <http://www.who.int/trade/glossary/story034/en/index.html>



13. Morissette, S. L., Almarsson, Ö., Peterson, M. L., Remenar, J. F., Read, M. J., Lemmo, A. V., Ellis, S., Cima, M. J., & Gardner, C. R. (2004). High-throughput crystallization: Polymorphs, salts, co-crystals and solvates of pharmaceutical solids. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 56(3), 275–300.
14. Lu, J., & Rohani, S. (2009). Polymorphism and crystallization of active pharmaceutical ingredients (APIs). *Current Medicinal Chemistry*, 16(7), 884-905.
15. Bernstein, J. (2002). *Polymorphism in Molecular Crystals*. Oxford University Press.
16. PharmaCareers. (2024, 18 Απριλίου). Types of dosage forms with examples. Ανακτήθηκε από <https://www.pharmacareers.in/types-of-dosage-forms-with-examples/>
17. Datta, S., & Grant, D. J. W. (2004). Crystal structures of drugs: Advances in determination, prediction, and engineering. *Nature Reviews Drug Discovery*, 3(1), 42-57.
18. Nangia, A., & Desiraju, G. R. (1999). Pseudopolymorphism: Occurrences of hydrogen bonding organic solvents in molecular crystals. *Chemical Communications*, 605-606.
19. Pedireddi, V. R., & PrakashaReddy, J. (2003). Supramolecular pseudopolymorphs: Double helix and planar structures with channels. *Tetrahedron Letters*, 44(32), 6679-6681.
20. Morris, K. R. (1999). In H. G. Brittain (Ed.), *Polymorphs in Pharmaceutical Solids*. Marcel Dekker.
21. Stahl, P. H., & Nakano, M. (2002). In P. H. Stahl & C. G. Wermuth (Eds.), *Handbook of Pharmaceutical Salts: Properties, Selection, and Use*. Wiley.
22. Aakeroy, C. B., Fasulo, M. E., & Desper, J. (2007). Cocrystal or salt: Does it really matter? *Molecular Pharmaceutics*, 4(3), 317-322.
23. Yu, L. (2001). Amorphous pharmaceutical solids: Preparation, characterization, and stabilization. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 48(1), 27-42.
24. Rodríguez-Spong, B., Price, C. P., Jayasankar, A., Matzger, A. J., & Rodríguez-Hornedo, N. (2004). General principles of pharmaceutical solid polymorphism: A supramolecular perspective. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 56(3), 241-274.
25. Tilley, R. J. D. (2006). *Crystals and Crystal Structures*. John Wiley & Sons.

26. Σολδάτος, Κ. Τ. (1980). Μαθήματα Ορυκτολογίας: Εισαγωγή εις την Κρυσταλλογραφία. Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης.
27. Atkins, P., de Paula, J., & Keeler, J. (2021). Φυσικοχημεία (Γ. Κωτσόπουλος, Μετάφρ. & Επιστ. Επιμ., 11η διεθνής έκδοση). Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης, ISBN 978-960-524-591-7.
28. Klein, C., & Hurlbut, C. S., Jr. (1993). Manual of Mineralogy (21st ed.). John Wiley & Sons.
29. Libretexts chemistry. (n.d.). Crystal lattices and unit cells. Ανακτήθηκε από [https://chem.libretexts.org/Courses/University\\_of\\_Arkansas\\_Little\\_Rock/Chem\\_1403%3A\\_General\\_Chemistry\\_2/Text/12%3A\\_Solids/12.01%3A\\_Crystal\\_Lattices\\_and\\_Unit\\_Cells](https://chem.libretexts.org/Courses/University_of_Arkansas_Little_Rock/Chem_1403%3A_General_Chemistry_2/Text/12%3A_Solids/12.01%3A_Crystal_Lattices_and_Unit_Cells)
30. Osazee, O.T. (2019). Bravais lattices: Why lattices are not classified based on shape. NIPES Journal of Science and Technology Research.
31. LibreTexts geosciences. (n.d.). Rotational symmetry, Ανακτήθηκε από [https://geo.libretexts.org/Bookshelves/Geology/Mineralogy\\_\(Perkins\\_et\\_al.\)/10%3A\\_Crystal\\_Morphology\\_and\\_Symmetry/10.01%3A\\_Symmetry/10.1.04%3A\\_Rotational\\_Symmetry](https://geo.libretexts.org/Bookshelves/Geology/Mineralogy_(Perkins_et_al.)/10%3A_Crystal_Morphology_and_Symmetry/10.01%3A_Symmetry/10.1.04%3A_Rotational_Symmetry)
32. Libretexts chemistry. (n.d.). Crystal lattices and unit cells. Ανακτήθηκε από [1.2: Miller Indices \(hkl\) - Chemistry LibreTexts](#)
33. Dunitz, J. D., & Bernstein, J. (1995). Disappearing polymorphs. Accounts of Chemical Research, 28(4), 193-200.
34. Bernstein, J., Davey, R. J., & Henck, J. O. (1999). Concomitant polymorphs. Angewandte Chemie International Edition, 38(23), 3440-3461.
35. Vippagunta, S. R., Brittain, H. G., & Grant, D. J. W. (2001). Crystalline solids. Advanced Drug Delivery Reviews, 48(1), 3-26.
36. Karpinski, P. (2006). Polymorphism of active pharmaceutical ingredients. Chemical Engineering & Technology, 29(2), 233-237.
37. Lin, S. Y. (2014). An overview of famotidine polymorphs: Solid-state characteristics, thermodynamics, polymorphic transformation, and quality control. Pharmaceutical Research, 31(7), 1619-1631.
38. Qiang, W., Kelley, K., & Tycko, R. (2013). Polymorph-specific kinetics and thermodynamics of  $\beta$ -amyloid fibril growth. Journal of the American Chemical Society, 135(18), 6860-6871.

39. Yu, L., Stephenson, G. A., Mitchell, C. A., Bunnell, C. A., Snorek, S. V., Bowyer, J. J., et al. (2000). Thermochemistry and conformational polymorphism of a hexamorphic crystal system. *Journal of the American Chemical Society*, 122(4), 585-591.
40. Wang, C. X., & Yang, G. W. (2005). Thermodynamics of metastable phase nucleation at the nanoscale. *Materials Science and Engineering: R: Reports*, 49(6), 157-202.
41. Lohani, S., & Grant, D. J. W. (2006). Thermodynamics of polymorphs. In R. Hilfiker (Ed.), *Polymorphism in the Pharmaceutical Industry* (pp. 21-42). Wiley-VCH.
42. Sirota, N. N. (1982). Certain problems of polymorphism (I). *Crystal Research and Technology*, 17(6), 661-691.
43. Beyer, T., Day, G. M., & Price, S. L. (2001). The prediction, morphology, and mechanical properties of the polymorphs of paracetamol. *Journal of the American Chemical Society*, 123(21), 5086-5094.
44. Haisa, M., Kashino, S., & Maeda, H. (1974). The orthorhombic form of p-hydroxyacetanilide. *Acta Crystallographica Section B: Structural Science*, 30(11), 2510-2512.
45. Haisa, M., Kashino, S., Kawai, R., & Maeda, H. (1976). The monoclinic form of p-hydroxyacetanilide. *Acta Crystallographica Section B: Structural Science*, 32(11), 1283-1285.
46. Di Martino, P., Guyot-Hermann, A.-M., Conflant, P., Drache, M., & Guyot, J.-C. (1996). A new pure paracetamol for direct compression: The orthorhombic form. *International Journal of Pharmaceutics*, 128(1), 1-8.
47. Di Martino, P., Conflant, P., Drache, M., Huvenne, J.-P., & Guyot-Hermann, A.-M. (1997). Preparation and physical characterization of forms II and III of paracetamol. *Journal of Thermal Analysis*, 48(2), 447-458.
48. Nichols, G., & Frampton, C. S. (1998). Physicochemical characterization of the orthorhombic polymorph of paracetamol crystallized from solution. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 87(6), 684-693.
49. Zimmermann, B., & Baranović, G. (2011). Thermal analysis of paracetamol polymorphs by FT-IR spectroscopies. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 54(2), 295-302.

50. Peterson, M. L., Morissette, S. L., McNulty, C., Goldsweig, A., Shaw, P., LeQuessne, M., et al. (2002). Iterative high-throughput polymorphism studies on acetaminophen and an experimentally derived structure for form III. *Journal of the American Chemical Society*, 124, 10958–10959.
51. Burley, J. C., Duer, M. J., Stein, R. S., & Vrcelj, R. M. (2007). Enforcing Ostwald's rule of stages: Isolation of paracetamol forms III and II. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 31, 271–276.
52. National Center for Biotechnology Information (2024). PubChem Compound Summary for CID 1983, Acetaminophen. Ανακτήθηκε από <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Acetaminophen>.
53. Ehmann, H., & Werzer, O. (2014). Surface mediated structures: Stabilization of metastable polymorphs on the example of paracetamol. *Crystal Growth & Design*, 14(9), 4270–4275.
54. Cambridge Crystallographic Data Centre. (2011). CSD Entry: HXACAN30, Ανακτήθηκε από [Search Results - Access Structures \(cam.ac.uk\)](#)
55. Cambridge Crystallographic Data Centre. (2011). CSD Entry: HXACAN08, Ανακτήθηκε από [Search Results - Access Structures \(cam.ac.uk\)](#)
56. Doherty, C., & York, P. (1988). Frusemide crystal forms – solid-state and physicochemical analyses. *International Journal of Pharmaceutics*, 47(2), 141–155.
57. Halebian, J. K., & McCrone, W. C. (1969). Pharmaceutical applications of polymorphism. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 58(7), 911–929.
58. Halebian, J. K. (1975). Characterization of habits and crystalline modification of solids and their pharmaceutical applications. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 64(8), 1269–1288.
59. Bernstein, J. (1987). Conformational polymorphism. In G. R. Desiraju (Ed.), *Organic solid state chemistry* (pp. 471–518). Amsterdam: Elsevier.
60. Morris, K. R., & Rodriguez-Hornado, N. (1993). Hydrates. In J. Swarbrick & J. Boylan (Eds.), *Encyclopedia of Pharmaceutical Technology* (Vol. 7, pp. 393–440). New York: Marcel Dekker.
61. Byrn, S. R., Pfeiffer, R. R., Stephenson, G., Grant, D. J. W., & Gleason, W. B. (1994). Solid-state pharmaceutical chemistry. *Chemistry of Materials*, 6(8), 1148–1158.

62. Brittain, H. G. (2002). Effects of mechanical processing on phase composition. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 91(7), 1573–1580.
63. Snider, A. D., Addicks, W., & Owens, W. (2004). Polymorphism in generic drug product development. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 56(3), 391–395.
64. Auer, M. E., Griesser, U. J., & Sawatzki, J. (2003). Qualitative and quantitative study of polymorphic forms in drug formulations by near infrared FT-Raman spectroscopy. *Journal of Molecular Structure*, 661–662, 307–317.
65. Pandey, B., Lohray, V. B., & Lohray, B. B. (2007). Importance of polymorphs and salts in the pharmaceutical industry. In M. S. Chorghade (Ed.), *Drug discovery and development: drug development* (Vol. 2, pp. 201–218). New Jersey: Wiley.
66. Hennigan, M. C., & Ryder, A. G. (2013). Quantitative polymorph contaminant analysis in tablets using Raman and near infra-red spectroscopies. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 72, 163–171.
67. Purohit, R., & Venugopalan, P. (2009). Polymorphism: An overview. *Resonance*, 14(10), 882–893.
68. Newman, W., & Byrn, S. (2003). Solid-state analysis of the active pharmaceutical ingredient in drug products. *Drug Discovery Today*, 8(20), 898–905.
69. Storey, R. A., & Ymén, I. (2011). *Solid state characterization of pharmaceuticals*. West Sussex: Wiley.
70. Καλαμπούνιας, Α. Γ., & Μυλωνά-Κοσμά, Α. (2018). Μοριακές κβαντικές καταστάσεις και στατιστική θερμοδυναμική. Εκδόσεις Συμμετρία.
71. Skoog, D. A., Holler, F. J., & Crouch, S. R. (2018). *Αρχές Ενόργανης Ανάλυσης* (7η έκδοση). Εκδόσεις Κωσταράκη.
72. Atkins, P. W., & de Paula, J. (2014). *Φυσικοχημεία* (11η έκδ.). Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης. ISBN: 9789605244316.
73. Burns, G. (1996). *Introduction to crystallography*. Oxford University Press.
74. Whiston, C. (1987). X-Ray methods. In E. Prichard (Ed.), *Analytical chemistry by open learning* (Vol. 11). Wiley.
75. Ali, A., Chiang, Y. W., & Santos, R. M. (2022). X-ray diffraction techniques for mineral characterization: A review for engineers of the fundamentals, applications, and research directions. *Minerals*, 12(2), 205.

76. Wang, I. C., Lee, M. J., Seo, D. Y., et al. (2011). Polymorph transformation in paracetamol monitored by in-line NIR spectroscopy during a cooling crystallization process. *AAPS PharmSciTech*, 12(3), 764–770.
77. Spiliopoulou, M., Valmas, A., Triandafillidis, D.-P., Kosinas, C., Fitch, A., Karavassili, F., & Margiolaki, I. (2020). Applications of X-ray powder diffraction in protein crystallography and drug screening. *Crystals*, 10(2), 54.
78. Li, S., Wu, X., Pan, Q., et al. (2014). Comparison of the accuracy of powder and single-crystal X-ray diffraction techniques in determining organic crystal structure. *Chinese Science Bulletin*, 59(5), 497–501.
79. Shankland, K. (2016). An overview of powder X-ray diffraction and its relevance to pharmaceutical crystal structures. In A. Müllertz, Y. Perrie, & T. Rades (Eds.), *Analytical techniques in the pharmaceutical sciences (Advances in Delivery Science and Technology)*. Springer.
80. Mighell, A. D. (1976). The single crystal vs. the powder method for identification of crystalline materials. *Advances in X-ray Analysis*, 20, 53–62.
81. Bunaciu, A. A., Udriștioiu, E., & Aboul-Enein, H. (2015). X-ray diffraction: Instrumentation and applications. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, 45(1), 10–22.
82. LibreTexts Chemistry. (n.d.), Preferred Orientation, Ανακτήθηκε από: [8.1: Preferred orientation - Chemistry LibreTexts](#)
83. Jung, H., Jeong, S., Park, Y., Shin, Y., & Jeong, H. (2022). X-ray diffraction analysis of damaged layer during polishing of silicon carbide. *International Journal of Precision Engineering and Manufacturing*, 24(1), 1-8.
84. Yeo, J. D., & Shahidi, F. (2019). Analysis of flavonoid-protein interactions by advanced techniques. In L. Melton, F. Shahidi, & P. Varelis (Eds.), *Encyclopedia of food chemistry* (pp. 539-543). Academic Press.
85. Gabrieli Alves de Oliveira, F., de Castilhos, F., Renard, C. M.-G. C., & Bureau, S. (2014). Comparison of NIR and MIR spectroscopic methods for determination of individual sugars, organic acids and carotenoids in passion fruit. *Food Research International*, 60, 154–162.
86. Mokari, A., Guo, S., & Bocklitz, T. (2023). Exploring the steps of infrared (IR) spectral analysis: Pre-processing, (classical) data modelling, and deep learning. *Molecules*, 28(19), 6886.

87. Ivanova, B. B. (2005). Monoclinic and orthorhombic polymorphs of paracetamol—solid state linear dichroic infrared spectral analysis. *Journal of Molecular Structure*, 738(1–3), 233–238.
88. Chanda, A. (2015). Evaluation and isolation of novel binding agent *Alstonia scholaris* in the formulation of tablet. *World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 4, 1247–1258.
89. Libretexts chemistry. (n.d.). Infrared Spectroscopy: Instrumentation, Ανακτήθηκε από [4.3: Instrumentation - Chemistry LibreTexts](#)
90. Agostini, G., & Lamberti, C. (2013). Characterization of semiconductor heterostructures and nanostructures (2nd ed.). Elsevier Science.
91. Libretexts chemistry. (n.d.). Raman Spectroscopy, Ανακτήθηκε από [5: Raman Spectroscopy - Chemistry LibreTexts](#)
92. Long, D. (2002). The Raman effect: A unified treatment of the theory of Raman scattering by molecules. Wiley.
93. Smith, E., & Dent, G. (2005). Modern Raman spectroscopy – A practical approach. Wiley.
94. Ferraro, J. R., Nakamoto, K., & Brown, C. W. (2003). Introductory Raman spectroscopy (2nd ed.). Academic Press.
95. Dey, T. (2022). Microplastic pollutant detection by surface enhanced Raman spectroscopy (SERS): A mini-review. *Nanotechnology for Environmental Engineering*, 8(1).
96. Cho, Y., & Ahn, S. (2020). Fabricating a Raman spectrometer using an optical pickup unit and pulsed power. *Scientific Reports*, 10(1), Article 12431.
97. Langkilde, F. W., Sjöblom, J., Tekenbergs-Hjelte, L., & Mrak, J. (1997). Quantitative FT-Raman analysis of two crystal forms of a pharmaceutical compound. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 15(6), 687–696.
98. Findlay, W. P., & Bugay, D. E. (1998). Utilization of Fourier transform-Raman spectroscopy for the study of pharmaceutical crystal forms. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 16(6), 921–930.
99. Taylor, L. S., & Zografi, G. (1998). The quantitative analysis of crystallinity using FT-Raman spectroscopy. *Pharmaceutical Research*, 15(5), 755–761.
100. Al-Zoubi, N., Koundourellis, J. E., & Malamataris, S. (2002). FT-IR and Raman spectroscopic methods for identification and quantitation of orthorhombic and



- monoclinic paracetamol in powder mixes. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 29(3), 459–467.
101. Hargreaves, M. D., Macleod, N. A., Smith, M. R., Andrews, D., Hammond, S. V., & Matousek, P. (2011). Characterisation of transmission Raman spectroscopy for rapid quantitative analysis of intact multi-component pharmaceutical capsules. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 54(3), 463–468.
102. Cullum, B. M., Mobley, J., Davis, G., & Vo-Dinh, T. (2000). Development of a portable Raman system for spectroscopic analysis. *Review of Scientific Instruments*, 71(4), 1602–1607.
103. Charoenrit, T. P., Wicharn, S., Puttharugsa, C., Limnonthakul, P., Sassuvun, W., Buranasiri, P., & Plaipichit, S. (2023). Backscattering and transmission Raman spectroscopy systems in the quantitative analysis concentration of acetone solutions. *Journal of Physics: Conference Series*, 2431(1), 012028.
104. Potter, K. B., Kollamaram, G., Zeglinski, J., Whitaker, D. A., Croker, D. M., & Walker, G. M. (2017). Investigation of polymorphic transitions of piracetam induced during wet granulation. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 119, 36-46.
105. DrugBank. (n.d.). Piracetam. DrugBank Online. Ανακτήθηκε από <https://go.drugbank.com/drugs/DB09210>
106. Winblad, B. (2005). Piracetam: A review of pharmacological properties and clinical uses. *CNS Drug Reviews*, 11(2), 169-182.
107. National Center for Biotechnology Information (2024). PubChem Compound Summary for CID 4843, Piracetam. Ανακτήθηκε από <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Piracetam>
108. Giurgea, C. (1972). Vers une pharmacologie de l'activité intégrative du cerveau. Tentative du concept nootrope en psychopharmacologie [Towards an integrative pharmacology of the activity of the brain. Attempt at the nootropic concept in psychopharmacology]. *Actualités Pharmacologiques (Paris)*, 25, 115–176
109. Jewett, B. E., & Sharma, S. (2024). Physiology, GABA. In StatPearls. StatPearls Publishing. Ανακτήθηκε από <https://www.statpearls.com>
110. Fabbiani, F. P. A., Allan, D. R., Parsons, S., & Pulham, C. R. (2005). An exploration of the polymorphism of piracetam using high pressure. *CrystEngComm*, 7, 79–186.
111. Pavlova, A. (1979). Polymorphisms of piracetam. *Pharmazie*, 34, 449–450.

112. Kuhnert-Brandstaetter, M., Burger, A., & Voellenkelee, R. (1994). Stability behaviour of piracetam polymorphs. *Scientific Pharmaceutical*, 62, 307–316.
113. Dračinský, M., Procházková, E., Kessler, J., Šebestík, J., Matějka, P., & Bouř, P. (2013). Resolution of organic polymorphic crystals by Raman spectroscopy. *The Journal of Physical Chemistry B*, 117(24), 7297-7307.
114. Maher, A., Seaton, C. C., Hudson, S., Croker, D. M., Rasmuson, Å. C., & Hodnett, B. K. (2012). Investigation of the solid-state polymorphic transformations of piracetam. *Crystal Growth & Design*, 12(12), 6223–6233.
115. Cambridge Crystallographic Data Centre. (2011). CSD Entry: BISMEV, Ανακτήθηκε από [Search Results - Access Structures \(cam.ac.uk\)](https://www.cam.ac.uk/structures/Search?_from=cam.ac.uk&_id=BISMEV)
116. Cambridge Crystallographic Data Centre. (2011). CSD Entry: BISMEV01, Ανακτήθηκε από [Search Results - Access Structures \(cam.ac.uk\)](https://www.cam.ac.uk/structures/Search?_from=cam.ac.uk&_id=BISMEV01)
117. Kakkar, S., Zeng, L., Svärd, M., & Rasmuson, Å. C. (2022). Characterization and crystal nucleation kinetics of a new metastable polymorph of piracetam in alcoholic solvents. *Crystal Growth & Design*, 22, 2964-2973.
118. Cambridge Crystallographic Data Centre. (2011). CSD Entry: BISMEV03, Ανακτήθηκε από [Search Results - Access Structures \(cam.ac.uk\)](https://www.cam.ac.uk/structures/Search?_from=cam.ac.uk&_id=BISMEV03)
119. Cambridge Crystallographic Data Centre. (2011). CSD Entry: BISMEV04, Ανακτήθηκε από [Search Results - Access Structures \(cam.ac.uk\)](https://www.cam.ac.uk/structures/Search?_from=cam.ac.uk&_id=BISMEV04)
120. Cambridge Crystallographic Data Centre. (2011). CSD Entry: BISMEV07, Ανακτήθηκε από [Search Results - Access Structures \(cam.ac.uk\)](https://www.cam.ac.uk/structures/Search?_from=cam.ac.uk&_id=BISMEV07)
121. Allen, F. H. (2002). The Cambridge Structural Database: a quarter of a million crystal structures and rising. *Acta Crystallographica Section B: Structural Science*, 58(3), 380-388
122. Blagden, N., Matas, M., Gavan, P. T., & York, P. (2007). Crystal engineering of active pharmaceutical ingredients to improve solubility and dissolution rates. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 59(7), 617-630
123. Maher, A., Croker, D., Rasmuson, Å. C., & Hodnett, B. K. (2010). Solubility of Form III Piracetam in a range of solvents. *Journal of Chemical & Engineering Data*, 55(11), 5314–5318.
124. Maher, A., Rasmuson, Å. C., Croker, D. M., & Hodnett, B. K. (2012). Solubility of the metastable polymorph of piracetam (Form II) in a range of solvents. *Journal of Chemical & Engineering Data*, 57(12), 3525–3531.

125. Chieng, N., Rades, T., & Aaltonen, J. (2011). An overview of recent studies on the analysis of pharmaceutical polymorphs. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 55(4), 618-644.
126. Stephenson, G. A., Forbes, R., & Reutzel-Edens, S. M. (2001). Characterization of the solid state: Quantitative issues. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 48(1), 67-90.
127. Croker, D. M., Hennigan, M. C., Maher, A., Hu, Y., Ryder, A. G., & Hodnett, B. K. (2012). A comparative study of the use of powder X-ray diffraction, Raman and near infrared spectroscopy for quantification of binary polymorphic mixtures of piracetam. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 63, 80-86
128. Burns, D. A., & Ciurczak, E. W. (2001). *Handbook of near-infrared analysis* (2nd ed., Vol. 27).
129. Raman, C. V., & Krishnan, K. S. (1928). A new type of secondary radiation. *Nature*, 121, 501-502
130. Byrn, S., Pfeiffer, R., Hoiberg, M., Ganey, C., & Poochikian, G. (1995). Pharmaceutical solids: A strategic approach to regulatory considerations. *Pharmaceutical Research*, 12(6), 945-954.
131. Alexander, L., & Klug, H. P. (1948). Basic aspects of X-ray absorption in quantitative diffraction analysis of powder mixtures. *Analytical Chemistry*, 20(12), 886-889.
132. Bugay, D. E., Newman, A. W., & Findlay, W. P. (1996). Quantitation of cefepime·2HCl dihydrate in cefepime·2HCl monohydrate by diffuse reflectance IR and powder X-ray diffraction techniques. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 15(1), 49-61.
133. Campbell Roberts, S. N., Williams, A. C., Grimsey, I. M., & Booth, S. W. (2002). Quantitative analysis of mannitol polymorphs: X-ray powder diffractometry-exploring preferred orientation effects. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 28(5), 1149-1159.
134. Dong, W., Gilmore, C., Barr, G., Dallman, C., Feeder, N., & Terry, S. (2008). A quick method for the quantitative analysis of mixtures. 1. Powder X-ray diffraction. *Pharmaceutical Technology*, 97, 2260-2276.

135. Németh, Z., Kis, G. C., Pokol, G., & Demeter, Á. (2009). Quantitative determination of famotidine polymorphs: X-ray powder diffractometric and Raman spectrometric study. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 49(2), 338–346.
136. Suryanarayanan, R. (1989). Determination of the relative amounts of anhydrous carbamazepine and carbamazepine dihydrate in a mixture by powder X-ray diffractometry. *Pharmaceutical Research*, 6(10), 1017–1024.
137. Tian, F., Zhang, F., Sandler, N., Gordon, K. C., McGoverin, C. M., Strachan, C. J., Saville, D. J., & Rades, T. (2007). Influence of sample characteristics on quantification of carbamazepine hydrate formation by X-ray powder diffraction and Raman spectroscopy. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 66(3), 466–474.
138. Lorena, C. (2024). Impact of polymorphism and particle size on the bioavailability of active pharmaceutical ingredients. *Journal of Formulation Science & Bioavailability*
139. Zhong, W. (2023). Polymorphism: The phenomenon affecting the performance of drugs. *Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*
140. Bernstein, J. (2007). 4 Analytical techniques for studying and characterizing polymorphs. In *Polymorphism in Molecular Crystals* (1st ed., International Union of Crystallography Monographs on Crystallography). Oxford University Press. Online edition, Oxford Academic, 1 Jan. 2010.
141. American Pharmaceutical Review. (n.d.). Understanding Infrared and Raman Spectra of Pharmaceutical Polymorphs. American Pharmaceutical Review. Ανακτήθηκε από <https://www.americanpharmaceuticalreview.com>
142. Ye, Y., Li, L., Smyth, J. R., & others. (2019). High-temperature X-ray diffraction, Raman and IR spectroscopy on serandite. *Physics and Chemistry of Minerals*, 46(8), 705–715.
143. Orlando, A., Franceschini, F., Muscas, C., Pidkova, S., Bartoli, M., Rovere, M., & Tagliaferro, A. (2021). A Comprehensive Review on Raman Spectroscopy Applications. *Chemosensors*, 9(9), 262.

Υπεύθυνη Δήλωση Συγγραφέα:

Δηλώνω ρητά ότι, σύμφωνα με το άρθρο 8 του Ν.1599/1986, η παρούσα εργασία αποτελεί αποκλειστικά προϊόν προσωπικής μου εργασίας, δεν προσβάλλει κάθε μορφής δικαιώματα διανοητικής ιδιοκτησίας, προσωπικότητας και προσωπικών δεδομένων τρίτων, δεν περιέχει έργα/εισφορές τρίτων για τα οποία απαιτείται άδεια των δημιουργών/δικαιούχων και δεν είναι προϊόν μερικής ή ολικής αντιγραφής, οι πηγές δε που χρησιμοποιήθηκαν περιορίζονται στις βιβλιογραφικές αναφορές και μόνον και πληρούν τους κανόνες της επιστημονικής παράθεσης.