

Farmaceutska primjena spektroskopije NMR u čvrstom stanju

Lukić, Gea

Undergraduate thesis / Završni rad

2023

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:250629>

Rights / Prava: [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-28**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb](#)





Sveučilište u Zagrebu
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET
Kemijski odsjek

Gea Lukić

Studentica 3. godine Preddiplomskog sveučilišnog studija KEMIJA

Farmaceutska primjena spektroskopije NMR u čvrstom stanju
Završni rad

Rad je izrađen u Zavodu za analitičku kemiju

Mentor rada: prof. dr. sc. Predrag Novak

Zagreb, 2023.

Datum predaje prve verzije Završnog rada:

17. ožujka 2023.

Datum ocjenjivanja Završnog rada i polaganja Završnog ispita:

22. rujna 2023.

Mentor rada: prof. dr. sc. Predrag Novak

Potpis:

Sadržaj

§ SAŽETAK.....	VI
§ 1. UVOD.....	1
§ 2. PRIKAZ ODABRANE TEME	3
2.1. Farmaceutska primjena spektroskopije NMR čvrstog stanja	3
2.1.1. <i>Razvoj tehnike spektroskopije NMR čvrstog stanja</i>	<i>3</i>
2.1.2. <i>Vrtinja uzorka pod magičnim kutom (MAS)</i>	<i>6</i>
2.1.3. <i>Direktna i križna polarizacija</i>	<i>8</i>
2.2. Strukturna analiza sastojaka farmaceutskih tvari	10
2.2.1. <i>Fizikalna i kemijska stabilnost lijekovitih pripravaka</i>	<i>10</i>
2.2.2. <i>Razlikovanje polimorfa</i>	<i>11</i>
2.2.3. <i>Analiza strukture kristaliničnih i amorfni oblika sastojaka lijekovitih pripravaka</i>	<i>14</i>
2.3. Upotreba spektroskopije NMR u čvrstom stanju za kvantifikaciju.....	17
§ 3. LITERATURNI IZVORI.....	XXV

§ Sažetak

Spektroskopija NMR u čvrstom stanju napredna je analitička tehnika koja se pokazala izuzetno korisnom za široku farmaceutsku primjenu. Spektar dobiven spektroskopijom NMR jedinstven je za svaku tvar i u tome leži njena važnost. Ova je tehnika neinvazivna, što znači da je za analizu dovoljna mala količina uzorka koja će biti očuvana i nakon snimanja NMR spektara. Interakcije koje su prisutne u spektroskopiji NMR u čvrstom stanju (ssNMR) su dipolne, kvadrupolne, spin-spin i Zeemanove interakcije, te anizotropija kemijskog pomaka. U spektrima NMR vodenih otopina rijetko kada se daju uočiti učinci anizotropije kemijskog pomaka i sprezanja dipol-dipol te stoga ne predstavljaju značajan problem. Zbog prisutnih interakcija, signali koji se dobiju snimanjem spektra NMR tvori u čvrstom stanju su široki i imaju rezoluciju značajno lošiju od one tvori u otopini. Postoji nekoliko tehnika za poboljšanje rezolucije, među kojima se ističu vrtnja pod magičnim kutem (MAS) i križna polarizacija kao najbitnije.

Spektroskopija NMR u čvrstom stanju je u farmaceutskoj industriji prvenstveno pronašla svoju primjenu u izučavanju polimorfa i pseudopolimorfa u kombinaciji sa spektroskopijom IR, termalnom analizom, optičkom mikroskopijom i rendgenskim kristalografskim tehnikama. Također, za razliku od većine spektroskopskih i difrakcijskih tehnika, može se koristiti za kalibraciju kvantifikacije drugim metodama. Još jedna izuzetno bitna primjena metoda ssNMR je proučavanje interakcija između aktivnih sastojaka i polimera koji sačinjavaju lijek, te razlikovanje tautomera.

§ 1. UVOD

Spektroskopija nuklearne magnetske rezonancije čvrstog stanja (ssNMR) metoda je za određivanje kemijske strukture, 3D strukture i dinamike krutih i polukrutih tvari na atomskoj razini te je stoga moćan i svestran spektroskopski alat u analizi farmaceutskih materijala. Neinvazivna priroda ove tehnike čini je prikladnom za analizu mnogobrojnih farmaceutskih pripravaka, te dobiveni podaci na makroskopskoj i mikroskopskoj razini pružaju uvid u fizička i kemijska svojstva i stabilnost komponenti lijekova.

Poznavanje kemijskih, fizičkih, biofizičkih i mehaničkih svojstava aktivnih i pomoćnih sastojaka farmaceutskih tvari izuzetno je bitno za razvoj i proizvodnju lijekova. Razumijevanje svojstava koja utječu na učinak ili aktivnost sastojaka je jedan od najbitnijih zadataka u farmaceutskoj znanosti. Stoga su glavne uloge analitičke kemije u razvoju lijekova identifikacija, kvantifikacija, razlikovanje polimorfnih oblika tvari u lijekovima te istraživanje interakcija aktivnih komponenti lijekova sa polimerima, kao i proučavanje mehanizma isporuke lijeka.

Interakcije spina jezgre te učinci magnetskih polja i radiofrekvencijskih pulseva na spinove jezgri isti su u NMR-u čvrstog stanja i u otopini. Međutim, zbog ovisnosti o orijentaciji interakcija spinova jezgri u čvrstom stanju, većina spektara NMR visoke rezolucije u čvrstom stanju dobiva se vrtnjom uzorka pod tzv. magičnim kutom (*Magic Angle Spinning, MAS*), čija je zadaća prvenstveno otkloniti učinke anizotropije kemijskog pomaka i pomoći pri uklanjanju učinka heteronuklearnog i homonuklearnog dipolnog sprežanja. Nakon vrtnje pod magičnim kutom, tehnika temeljena na križnoj polarizaciji je iduća najčešće korištena tehnika u spektroskopiji NMR čvrstog stanja. Inače se koristi kako bi pomogla pri snimanju spektara uzoraka u kojima postoji vrlo mala vjerojatnost da će biti više od jednog magnetski aktivnog atoma u molekuli.

Spektroskopijom NMR čvrstog stanja mogu se snimati spektri jezgri ^1H , ^{13}C , ^{19}F , ^{15}N koje su uvelike prisutne u brojnim ljekovitim tvarima i farmaceutskim pomoćnim tvarima i čest su izbor spinova za snimanje spektroskopijom NMR. Ova metoda pokazala je sljedeće mogućnosti analize farmaceutskih materijala. Prije svega, tehnika je inherentno kvantitativna, za razliku od

većine spektroskopskih i difrakcijskih tehnika. Iz tog razloga, često se koristi za kalibraciju kvantifikacije drugim metodama. Također može pouzdano razlikovati polimorfe aktivnih sastojaka lijekova, kristalnih i amorfnih oblika ljekovitih supstanci i pomoćnih tvari u složenim formulacijama na temelju njihovih strukturnih, kemijskih i spektroskopskih razlika. Nadalje, može razjasniti molekulske strukture i interakcije farmaceutskih materijala na atomskoj razini, a molekulska gibanja u trajanju od pikosekunde do sekunde. Na kraju, jako je praktično što ova analitička tehnika ne zahtijeva obradu uzorka prije analize.

Ovim završnim radom nastojao se prikazati cjelovit pregled mogućnosti korištenja spektroskopije NMR u čvrstom stanju u farmaceutskoj industriji te metoda za dobivanje boljih rezultata ovom tehnikom, kao i mogućih nedostataka prilikom provedbe tog postupka.

§ 2. PRIKAZ ODABRANE TEME

2.1. Farmaceutska primjena spektroskopije NMR čvrstog stanja

2.1.1. Razvoj tehnike spektroskopije NMR čvrstog stanja

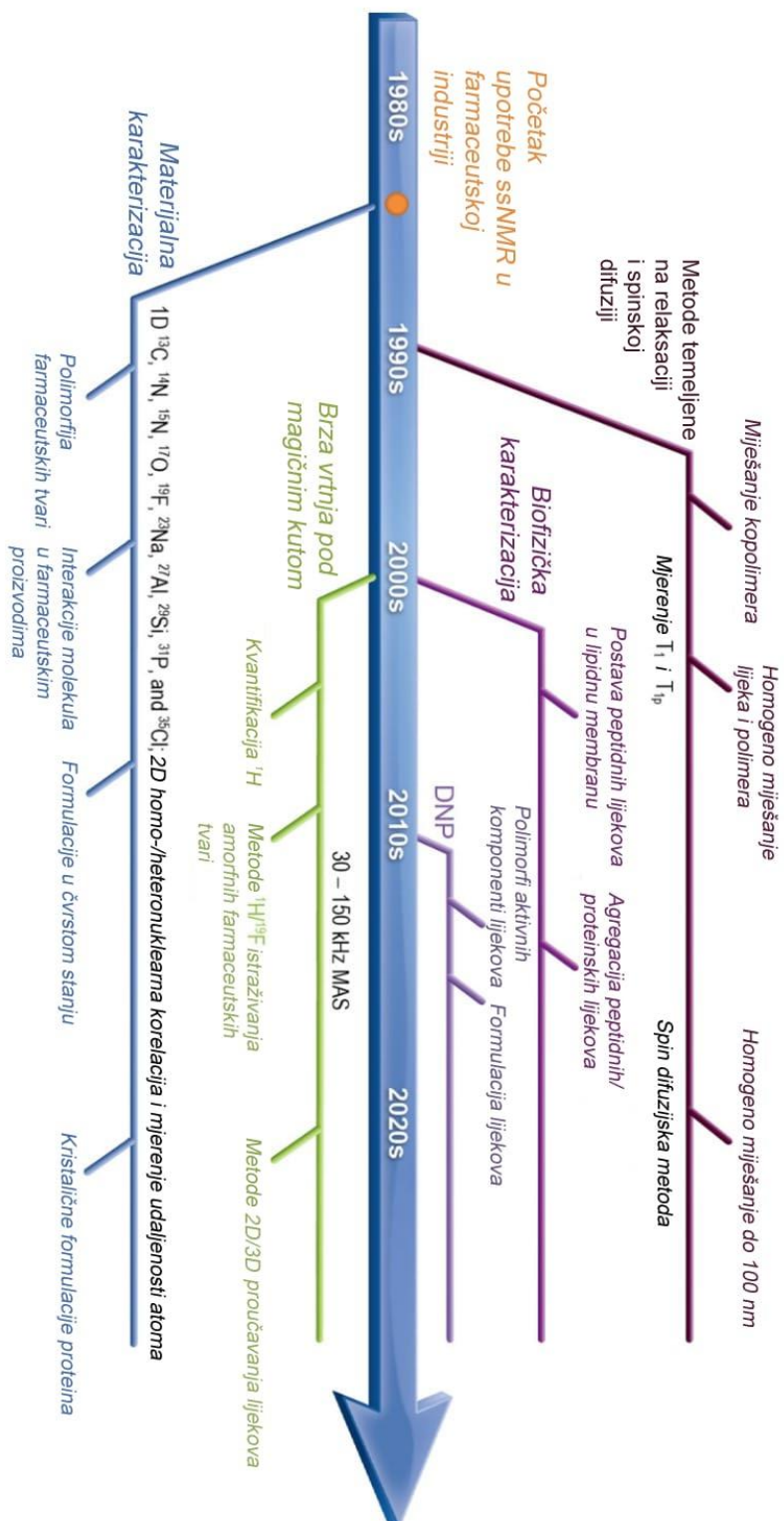
Spektroskopija NMR čvrstog stanja analitička je tehnika sa raznovrsnom primjenom u istraživanjima i razvoju farmaceutskih tvari. Za uspješan razvoj formulacije lijeka potrebne su informacije o složenom međudjelovanju sastojaka, njihovoj stabilnosti i bioraspoloživosti, kao i odabir odgovarajućeg načina mehaničke obrade. Glavne funkcije analitičkih tehnika u razvoju farmaceutskih tvari često uključuju identifikaciju, kvantifikaciju i istraživanje svojstava farmaceutskih materijala na makroskopskoj i mikroskopskoj razini. Primjerice, polimorfni oblici ljekovitih tvari i višekomponentni lijekovi zahtijevaju analitičke tehnike koje mogu razlikovati te kvantificirati razne kemijske sastojke u njihovim kristaliničnim i amorfnim oblicima. Štoviše, mehaničko razumijevanje formulacija lijekova putem razumijevanja molekulske strukture i interakcija u pripravku u čvrstom stanju može pružiti temeljne smjernice za razvoj lijekova, pri čemu je problem nedostatak alata visoke razlučivosti.



Slika 1. Uloge spektroskopije NMR čvrstog stanja kao napredne analitičke tehnike u farmaceutskoj industriji

U spektroskopiji NMR čvrstog stanja uzorci su najčešće u obliku praha, što znači da se sastoje od mnogobrojnih nasumično orijentiranih kristala. Interakcije koje su prisutne u spektroskopiji NMR u čvrstom stanju su dipolne, kvadrupolne, spin-spin i Zeemanove interakcije, te anizotropija kemijskog pomaka. Rezultat ovih interakcija jesu široke linije koje

se dobiju snimanjem spektra NMR, te je rezolucija takvog spektra značajno smanjena u odnosu na rezoluciju spektra otopine uzorka. U posljednjih se desetak godina uvelike radi na unaprjeđenju spektroskopije NMR čvrstog stanja kako bi se postigla veća osjetljivost, čime se nastoji povećati mogućnosti karakterizacije farmaceutskih tvari. Na primjer, vrtnja uzorka pod magičnim kutom značajno smanjuje homonuklearne i heteronuklearne interakcije spinova dok je križna polarizacija revolucionarna tehnika za povećanje osjetljivosti koja koristi prijenos polarizacije sa jezgara koje su jako magnetizabilne s velikom žiromagnetnom konstantom na jezgre koje imaju malu konstantu.



Slika 2. Napredak tehnike spektroskopije NMR u čvrstom stanju i primjene u farmaceutskoj industriji

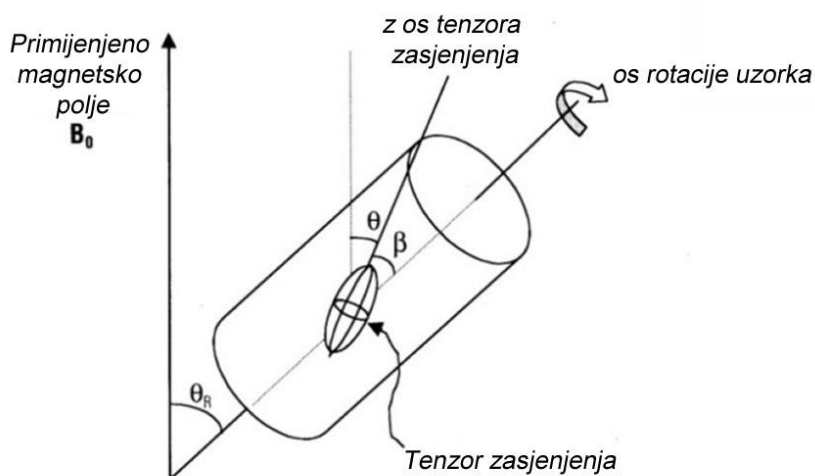
2.1.2. Vrtanja uzorka pod magičnim kutom (MAS)

U ljevitim tvarima i proizvodima u čvrstoj fazi molekule se orijentiraju nasumično i ne vrte se slobodno, što često rezultira širokim signalima u spektru NMR. To je zbog interakcija spinova koje ovise o orijentaciji, uključujući anizotropiju kemijskog pomaka, dipolnu i kvadrupolnu spregu. Iako dobiveni spektri sadrže brojne informacije o orijentacijama molekula i njihovom kretanju, gubitak razlučivanja onemogućuje širu primjenu ove metode. Jedna od tehnika koja se primjenjuje za dobivanje visokog razlučivanja je *vrtanja pod magičnim kutom*.

Primarni je zadatak vrtanje pod magičnim kutom je uklanjanje efekta anizotropije kemijskog pomaka. Vrtanja pod magičnim kutom također se koristi kako bi pomogla pri uklanjanju efekta heteronuklearnog sprežavanja i sužavanju linija koje nastaju kao posljedica kvadrupolnog sprežavanja. U otopini se anizotropija kemijskog pomaka, dipolno sprežavanje i ostali efekti rijetko pojavljuju jer su zbog brzog izotropnog kretanja molekula te interakcije uprosječene na nulu. Vrtanjem uzorka pod magičnim kutom nastoji se imitirati kretanje molekula u otopini. Uzorak, smješten duž osi z, rotiramo pod kutom $\theta=54,7$ u odnosu na vektor primijenjenog magnetskog polja [1,4]. Prosječna ovisnost orijentacije intrakcije nuklearnog spina, $(3\cos^2\theta - 1)$, prikazuje se izrazom

$$(3\cos^2\theta - 1) = \frac{1}{2} (3\cos^2\theta_R - 1)(3\cos^2\beta - 1). \quad (2.1)$$

Kutevi β i θ_R prikazani su na slici 3.



Slika 3. Vrtanja uzorka pod magičnim kutom. Uzorak rotira oko osi vrtanje pod kutom $\theta_R=54,74$ u odnosu na B_0 . Tenzor zasjenjenja prikazan je elipsoidom. Kut θ je kut između B_0 i z osi, dok β predstavlja kut između z osi tenzora zasjenjenja i osi oko koje rotira uzorak.

Potrebno je odrediti brzinu vrtanje pod magičnim kutom pri kojoj je signal što uži. Brzina vrtanje treba biti za faktor 3 ili 4 veća u odnosu na anizotropnu interakciju koju se nastoji ukloniti. Ukoliko je brzina vrtanje nedovoljna, dolazi do pojave signala tzv. *spinning sidebands* uz već prisutnu liniju izotropnog kemijskog pomaka. Linija izotropnog pomaka je jedina linija koja ostaje konzistentna unatoč promjeni brzine vrtanje, što omogućava njenu identifikaciju. Neželjene se linije jednostavno uklone povećanjem brzine vrtanje uzorka. Kada uređaj ne može dostići dovoljnu brzinu koristi se poseban pulsni slijed, Total Suppression of Spinning Sidebands (TOSS). Pulsni slijed se sastoji od inicijalnog pulsa od 90° nakon kojeg slijedi niz pulseva primijenjenih pod kutom od 180° . Inicijalni puls stvara transverzalnu magnetizaciju duž x osi, dok pulsevi od 180_x° u pulsnom slijedu rotiraju sve komponente magnetizacije za 180° oko x osi. Osim što je moguće na ovaj način ukloniti linije *spinning sidebands*, moguće ih je koristiti za prikupljanje detaljnih informacija o anizotropnim interakcijama koje se nastoji uprosječiti na nulu vrtanjem pod magičnim kutom.

Magični kut mora biti precizno postavljen kako bi se izbjeglo primjetno proširenje linija u spektru. Faktor $(3\cos^2\theta - 1)$ (jednadžba 2.1.) pri magičnom kutu iznosi nula, dok je za loše postavljen kut vrtanje različit od nula te će spektar sadržavati proširene linije umjesto oštarih. Kako bi bilo moguće precizno odrediti magični kut, potrebno je da uzorak daje dobar signal sa mnogo oštarih linija *spinning sidebands* bez potrebe za rasprezanjem uz umjerenu brzinu vrtanje. U praksi se magični kut postavlja tako da se uzorak, koji se vrti frekvencijom od 3 Hz, podvrgne konvencionalnom pulsnom slijedu. Snimi se nekoliko spektara te se identificira najjači, središnji signal. Nakon Fourierove transformacije, kada je spektar u fazi, postavi se frekvencija tako da je središnji signal blizu rezonancije. Kada je magični kut uspješno postavljen moguće je identificirati deset ili više *spinning sidebands* sa svake strane središnjeg signala [4].

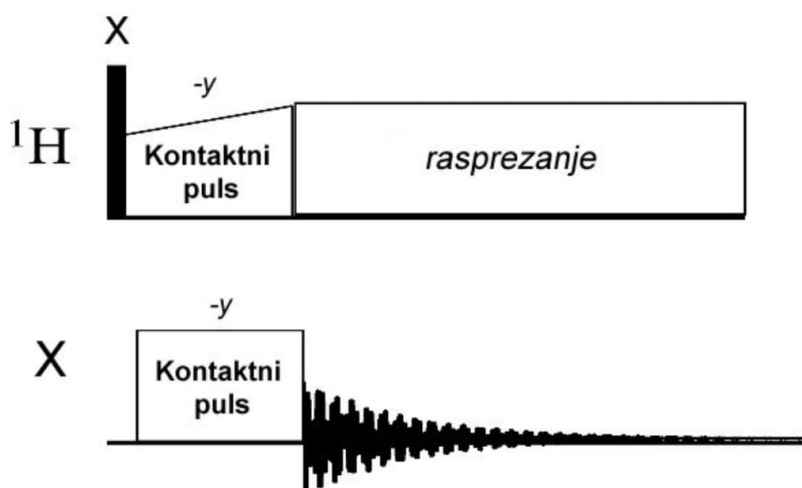
Većina laboratorija ssNMR u farmaceutskim laboratorijima koristi brzinu rotacije 4-15 kHz. Vrtanja pod magičnim kutom u takvom režimu u kombinaciji s ^1H heteronuklearnim rasprezanjem služi u svrhu rutinske karakterizacije, koja podrazumijeva detekciju jezgri ^{13}C , ^{15}N , ^{19}F i ^{31}P [3]. Posljednjih godina, brzo uzorkovanje podrazumijeva vrtanju od 60 kHz i više

te je komercijalno dostupno. Novije studije pokazale su potencijal ultrabrzog (UF) MAS-a na frekvenciji većoj od 100 kHz u svrhu farmaceutske karakterizacije, posebno za određivanje strukture proteina [2].

2.1.3. Direktna i križna polarizacija

Unakrsna ili križna polarizacija, također poznata kao proton-pojačana nuklearna indukcijska spektroskopija, je tehnika nuklearne magnetske rezonancije čvrstog stanja (ssNMR) za prijenos nuklearne magnetizacije iz različitih tipova jezgri putem heteronuklearnih dipolarnih interakcija. Nakon vrtnje pod magičnim kutom, križna polarizacija jedna je od najčešće korištenih tehnika u spektroskopiji NMR čvrstog stanja. Križna polarizacija dramatično poboljšava kvalitetu većine spektara dobivenih korištenjem spektroskopije NMR čvrstog stanja koji uključuju jezgre spina $\frac{1}{2}$. Koristi se pri snimanju spektara slabo zastupljenih jezgri, primjerice ^{13}C . Može se koristiti kako bi se dobile informacije o udaljenosti između spinova te za editiranje spektara.

Kada se snimaju spektri slabo zastupljenih jezgri problem predstavljaju omjer broja signala i šuma, koji je izuzetno loš, i dugačka relaksacijska vremena slabo zastupljenih jezgri koja zahtijevaju pauze između snimanja spektra u trajanju reda veličine minute. Pulsni slijed križne polarizacije (slika 4.) rješava oba navedena problema prijenosom magnetizacije sa spinova ^1H , na spinove X, koji su slabo zastupljeni. Kako bi objašnjenje tehnike bilo jednostavnije, može se smatrati da se spinovi jezgri ^1H i X nalaze se u ravnini koja rotira oko osi z, koja predstavlja vektor magnetskog polja B_0 . Inicijalni puls, prikazan na slici 4, stvara magnetizaciju duž -y osi. Potom je na obje vrste jezgri primijenjen kontaktni puls koji služi kako bi se stvorena magnetizacija zadržala na osi -y.



Slika 4. Pulsni slijed križne polarizacije. Postignut je prijenos magnetizacije sa jezgara ^1H , koje su prisutne u velikom broju, na jezgre X djelovanjem dipolnog sprežanja između jezgri ^1H i X.

Razmatramo dvostruko rotirajuću referentnu rešetku tako da se pulsevi primijenjeni na obje vrste spinova čine nepomični duž y osi tijekom primjene kontaktnog pulsa. Na početku kontaktnog pulsa u ovoj rešetki nema polarizacije jezgre X. Dipolna sprega između jezgri ^1H i X ovisi o operatorima koji djeluju u smjeru okomitom na kvantizacijsku os spinova. Prema tome, učinci tih operatora ne mogu promijeniti neto polarizaciju spina duž kvantizacijske osi, niti mogu promijeniti neto energiju kombiniranog ^1H , X spinskog sustava. Dakle, za svaki ^1H spin koji se zarotira, X spin se mora zarotirati u suprotnom smjeru, što bi trebao biti proces za koji ukupna promjena energije iznosi nula. Kada je ispunjen Hartmann-Hahnov uvjet, energetske razmace između rotirajućih okvira H i X stanja spina su isti.

Prije provedbe eksperimenta, potrebno je postaviti pokus križne polarizacije na standardnom (referentnom) uzorku prije njegove primjene na uzorku od interesa. Odgovarajući standard mora imati dvije jezgre koje će se koristiti u pokusu križne polarizacije prisutne u razumnoj koncentraciji i u prostornoj blizini jedna drugoj, kako bi se osigurao dobar prijenos polarizacije. U idealnom slučaju, brojnija jezgra sa koje se prenosi polarizacija trebala bi imati razumno kratko relaksacijsko vrijeme tako da se probni spektri mogu brzo snimiti. Jezgra X na koju se prenosi polarizacija trebala bi dati signale u sličnom rasponu onima koji se očekuju u uzorcima koji se mjere. Ako se u pokusu koristi vrtnja pod magičnim kutom, prvo treba odrediti brzinu vrtnje koja će biti potrebna u eksperimentima s križnom

polarizacijom. Važno je da brzina vrtnje ne bude prebrza s obzirom na dipolne sprege koje posreduju u polarizacijskom prijenosu ili je učinkovitost prijenosa ozbiljno smanjena. Većina standardnih pulsnih programa križne polarizacije na suvremenim spektrometrima također uključuje neku vrstu raspredanja tijekom prikupljanja signala. Sljedeći korak je postavljanje kanala ^1H na rezonanciju i mjerenje približne duljine pulsa od 90 stupnjeva za vrtnju ^1H jezgri. Treba biti samo približna jer se kasnije može bolje utvrditi u eksperimentu križne polarizacije, tako da je vrijednost iz prethodnog eksperimenta obično u redu.

Sljedeće što je porebno jest zadovoljiti Hartmann-Hahnov uvjet, prikazan formulom (2.2). [5]

$$\gamma_S \cdot B_S = \gamma_{1H} \cdot B_{1H} \pm n \cdot \omega_r \quad (2.2)$$

dobro postavljeni uvjeti snimanja ključni su za uspjeh eksperimenta. Ako su uvjeti dobro određeni u standardnom eksperimentu, mogu se koristiti za daljnja mjerenja. [6]

Direktna i križna (1D) polarizacija često se koriste za kvantifikaciju faznih konverzija i istraživanje molekulskih interakcija u lijeku. Križna polarizacija je izuzetno korisna kada je potrebno snimiti spektar izotopno obilježenih proteina, što zahtijeva prijenos polarizacije sa jezgri ^{15}N na jezgre ^{13}C .

2.2. Strukturna analiza sastojaka farmaceutskih tvari

2.2.1. Fizikalna i kemijska stabilnost lijekovitih pripravaka

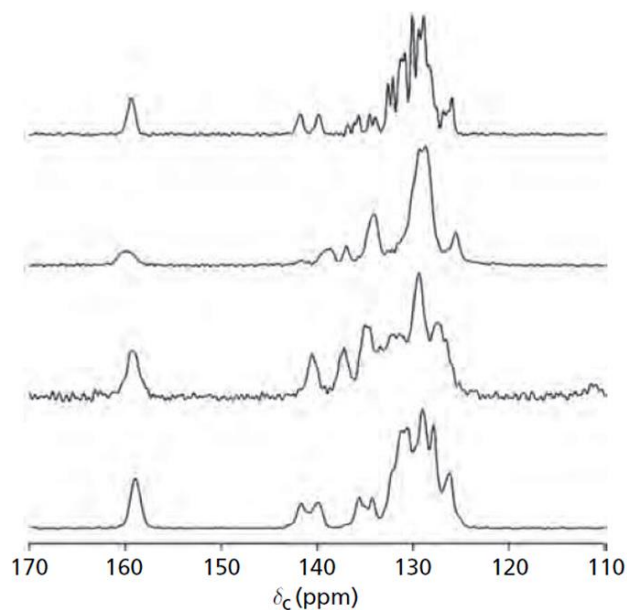
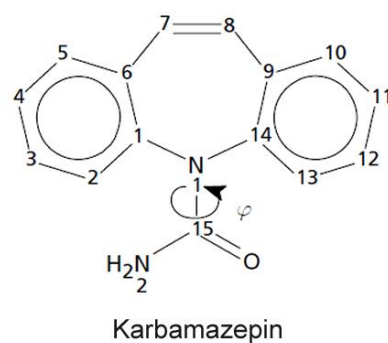
Aktivni sastojci lijekovitih tvari mogu postojati u različitim čvrstim oblicima, uključujući kristalične polimorfne i amorfne oblike, solvate, hidrate, i soli. Zbog razlika u kemijskim i fizikalnim svojstvima, polimorfni oblici mogu se razlikovati po kemijskoj reaktivnosti, fizikalnoj stabilnosti i topljivosti, što izravno utječe na stabilnost i bioraspoloživost lijekova [7]. Neočekivana transformacija farmaceutskog oblika aktivnog sastojka tijekom razvoja, proizvodnje, otpreme i skladištenja lijeka predstavlja značajan rizik za smanjenje njegove kvalitete, sigurnosti i učinkovitosti. Primjer toga je promjena farmaceutskog oblika lijeka Ritonavira 1998. [8]. Novi, stabilniji kristalinični oblik Ritonavira otkriven je tijekom pripravka njegove suspenzije. Pojava novog oblika čija je topljivost drastično manja značila je povećan rizik rekristalizacije u otopini za oralnu primjenu. Netopljivost ovog novog oblika značajno je smanjila bioraspoloživost što je na kraju rezultiralo povlačenjem proizvoda s tržišta. Zbog

važnosti fazne stabilnosti tvari u farmaceutskim pripravcima, regulatorne agencije izdale su smjernice o polimorfizmu za razvoj novih lijekova [9]. Tehnika vrtnje pod magičnim kutom pokazuje značajne prednosti u identifikaciji, kvantifikaciji i istraživanju stabilnosti oblika aktivnih sastojaka lijekova zahvaljujući njenoj kvantitativnoj prirodi te visokoj osjetljivosti na kemijske strukture. Može se, primjerice, koristiti za identificiranje konverzija kristalnog oblika u kristalni ili amorfni oblik.

2.2.2. Razlikovanje polimorfa

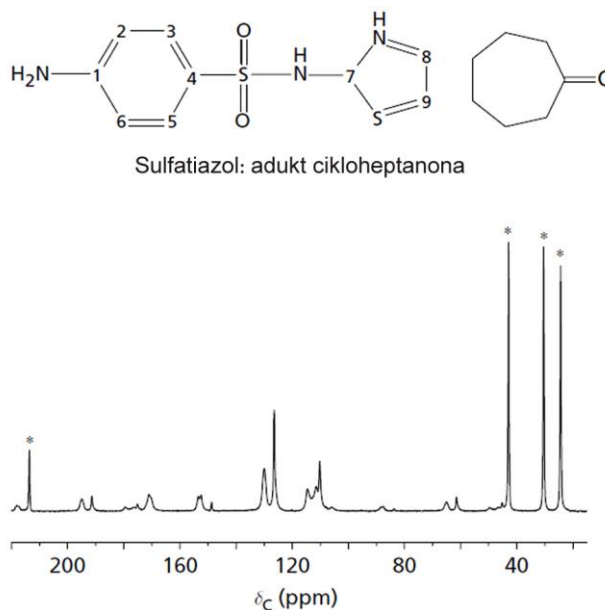
Problemi koji uključuju polimorfizam organskih i farmaceutskih tvari jedan su od bitnih problema u farmaceutskoj industriji. Metastabilni se oblici često proizvode i koriste, ali nisu uvijek prepoznati kao takvi. Neočekivani prijelazi i jednog u drugi oblik tvari javljaju se tijekom obrade i skladištenja, a ponovljivost proizvodnje može biti problem, dajući takozvane nestajuće polimorfe [10], što je vitalno kod uspostavljanja i zaštite patenata. Sve to znači da su alati za prepoznavanje i praćenje polimorfa i solvata itekako potrebni. Spektroskopija NMR čvrstog stanja može riješiti različite probleme ove prirode, što potvrđuju idući primjeri.

Na slici 10 prikazani su spektri ^{13}C MAS četiri bezvodna oblika karbamazepina [11]. Većina signala se javlja u uskom rasponu kemijskog pomaka (uzrokujući spektralno preklapanje). Unatoč tomu, svi spektri su primjetno različiti, tako da se NMR može koristiti za identifikaciju.



Slika 5. Spektri ^{13}C NMR dobiveni korištenjem tehnika križne polarizacije i vrtnje pod magičnim kutom (^{13}C CP MAS) različitih polimorfa karbamazepina. Odozgo prema dolje: trigonalni oblik, P-monoklinski oblik, C-monoklinski oblik, triklinski oblik.

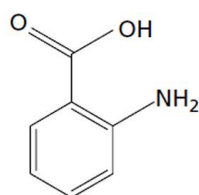
Slika 6. ilustrira spektar ^{13}C cikloheptanon solvata sulfatiazola (II) [12]. Signali koji proizlaze iz ugrađenih molekula otapala mogu se lako razlikovati i može se pokazati da je molekularni omjer molekule domaćina i otapala 1:1.



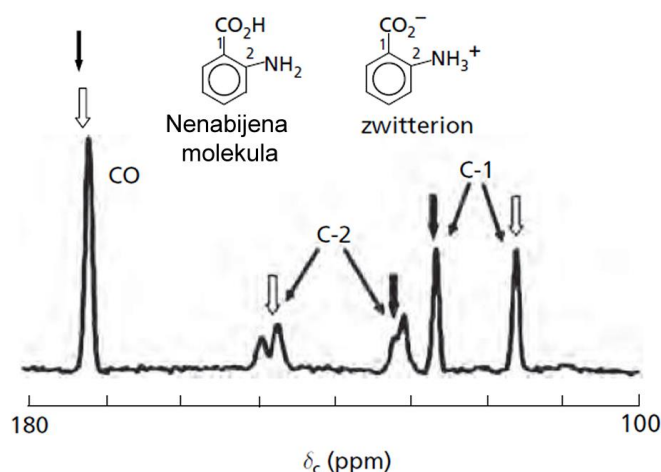
Slika 6. Spektri ^{13}C NMR dobiveni korištenjem tehnika križne polarizacije i vrtnje pod magičnim kutom (^{13}C CP MAS) adukta cikloheptanona sulfatiazola. Signali koje daje cikloheptanonski dio su označen zvjezdicama.

Pomoću NMR u čvrstom stanju jednostavno je pratiti fazne prijelaze. Kinetika se također može lako odrediti u roku od minute do dana (i dulje ako su uzorci održavati na relevantnim temperaturama izvan spektrometra između snimanja). Za brze prijelaze, može biti teško izmjeriti kinetiku, ali u takvim slučajevima postaje lako odrediti prijelazne temperature.

Spektroskopija NMR u čvrstom stanju omogućava i detekciju tautomera u polimorfima. Sporno je pitanje hoće li se različiti tautomerni oblici smatrati polimorfima, ali svakako je njihovo otkrivanje od neke važnosti. Sustav 2-aminobenzojeve kiseline (III) uključuje najmanje tri oblika. Postavlja se pitanje sadrže li ti oblici neutralne molekule ili zwitterione, na što ^{13}C MAS NMR daje direktan odgovor [13], budući da se očekivani kemijski pomaci uvelike razlikuju. Dva oblika sadrže samo neutralne molekule, dok treći ima asimetričnu jedinicu koja se sastoji od jedne neutralne molekule i jednog zwitteriona, što se može jasno vidjeti sa slike 7.



2- Aminobenzojeva kiselina (nenabijeni oblik molekule) (III)



Slika 7. Spektri ^{13}C NMR dobiveni korištenjem tehnika križne polarizacije i vrtnje pod magičnim kutom (^{13}C CP MAS) različitih oblika 2-aminobenzojeve kiseline dobiven pomoću dipolarnog defazirajućeg pulsog slijeda, tako da su dobiveni samo oni signali koji proizlaze iz kvaternih ugljika. Jedinične ćelije ovog polimorfa sadrže i neutralne molekule i zwitterione.

Signali iz neutralnih molekula označeni su otvorenim strelicama;

oni iz zwitteriona označeni su zatvorenim strelicama.

2.2.3. Analiza strukture kristaliničnih i amorfnih oblika sastojaka ljekovitih pripravaka

Osim za identifikaciju faznih promjena, spektroskopija NMR u čvrstom stanju je alat za otkrivanje detaljnih informacija o strukturi tvari. Tzv. kristalografija NMR hibridni je pristup koji integrira tehniku vrtnje pod magičnim kutom s molekulskim modeliranjem, kvantnim izračunima i drugim tehnikama, kao što je PXRD, za predviđanje struktura malih molekula. Spektroskopija NMR u čvrstom stanju omogućuje provjeru valjanosti, usavršavanje i određivanje strukture kristalnih i mikrokristalnih krutina [14,15,16].

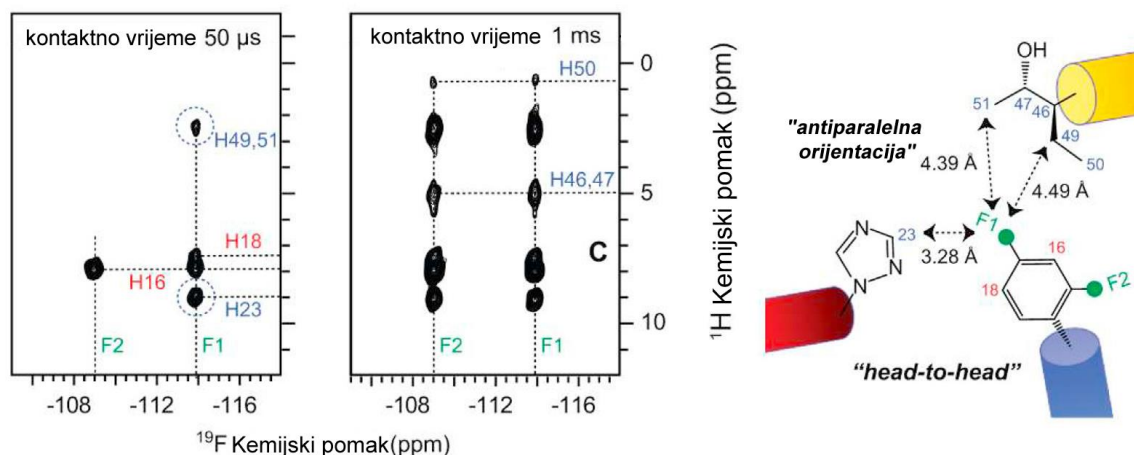
Elena i sur. demonstrirali su određivanje kristalne strukture mikrokristaliničnih krutina korištenjem podataka iz spinske difuzije protona (PSD), koja daje informacije o međusobnoj udaljenosti dvaju protona, u kombinaciji s molekulskim modeliranjem [14]. Predviđanje kristalne strukture *ab initio* integrirano je s eksperimentalnim kemijskim pomacima ^1H i

izračunima kemijskih pomaka pomoću metode DFT za određivanje struktura farmaceutskih krutina visoke rezolucije [15].

Asignacija kemijskih pomaka u kristalografiji NMR od izuzetne je važnosti. Harper i suradnici mjerili su i modelirali točne tenzore kemijskih pomaka atoma ^{13}C i ^{15}N u krutinama organskih tvari kako bi odredili njihove kristalne strukture [17,18]. Kemijski pomaci mogu pomoći pri identifikaciji intermolekulske vodikove veze i razlikovanju statičkih i dinamičkih poremećaja u kristalnim tvarima [19]. Osim istraživanja strukture kristalnih tvari, pakiranje molekula u amorfnim materijalima područje je puno potencijala koje za sada ostaje uglavnom neistraženo. Posljednjih godina sve je češće korištenje difrakcijske i vibracijske spektroskopije za prikupljanje takvih informacija.

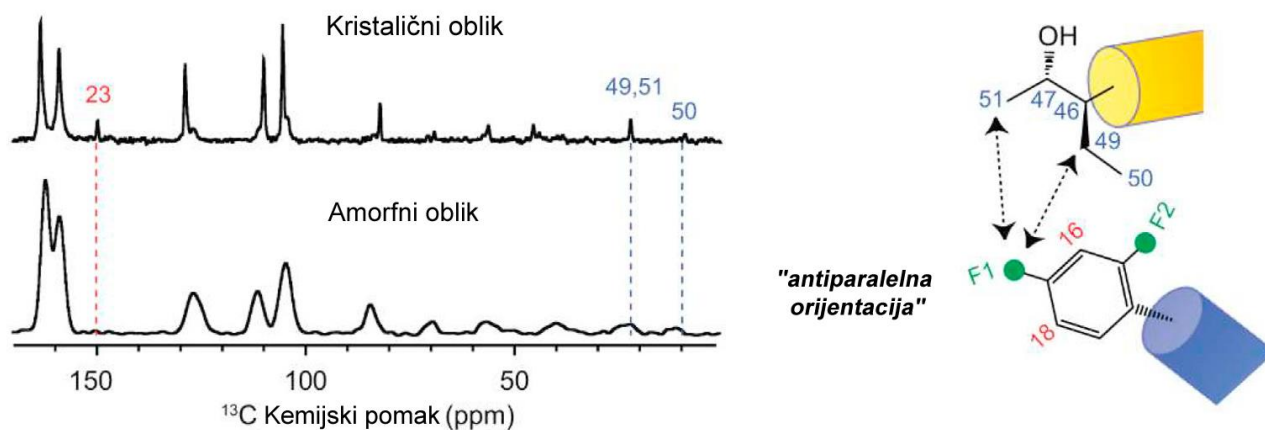
Kao jedan od najčešće propisivanih lijekova, levotiroksin pokazuje visoku kemijsku nestabilnost, što je rezultiralo povlačenjem brojnih proizvoda sa tržišta. Da bi se istražila stabilnost lijeka, strukture levotiroksin natrij pentahidrata (LSP) i levotiroksin natrij monohidrata (LSM) određene su difrakcijom rendgenskih zraka na monokristalu [20]. Spektroskopija NMR čvrstog stanja ^1H i ^{13}C korištena je za istraživanje strukturne promjene LSP-a koju izaziva dehidracija u temperaturnom rasponu od 25 do 80°C pri 0% relativne vlažnosti. Različit kemijski pomak i cijepanje signala dvaju asimetričnih konformera u kristalnoj rešetki LSP-a dokaz su da tijekom procesa dehidracije dolazi do promjene konformacije. Strukturni poremećaj nakon gubitka četiri vezane vode dovodi do nastanka elektrofilne molekule LSM u kojoj između karboksilnih skupina i atoma natrija nastaje struktura slična romboidnoj, koja može objasniti visoku kemijsku reaktivnost monohidratnog oblika.

Su i suradnici identificirali su bitne razlike između pakiranja molekula u kristaličnom i amorfnom obliku posakonazola (POSA) korištenjem homonuklearne i heteronuklearne korelacijske spektroskopije ^1H , ^{13}C i ^{19}F i mjerenja atomske udaljenosti ^{19}F - ^{13}C [21]. Interakcija duž glavne osi molekule i antiparalelno pakiranje molekula okomito na glavnu os u kristalima POSA sažeti su pomoću tehnike vrtnje pod magičnim kutom kao što je prikazano na slici 8 [21].



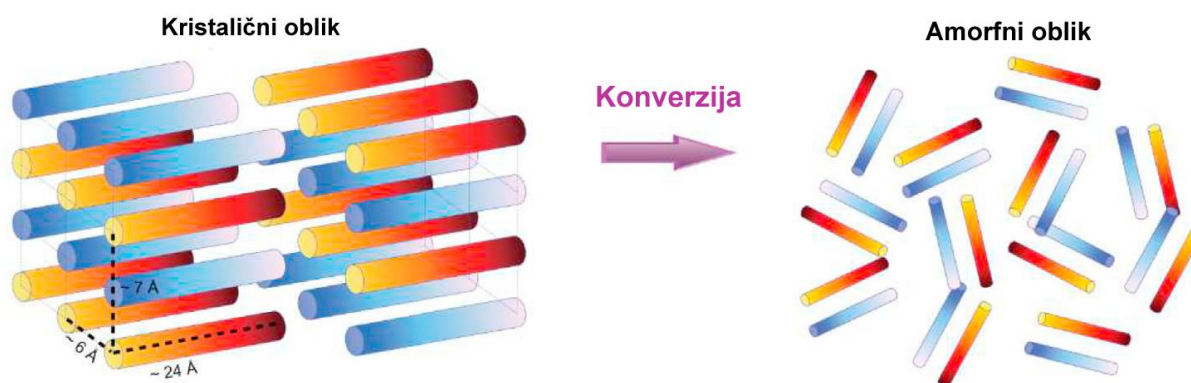
Slika 8. Heteronuklearni korelacijski spektri 2D ^{19}F - ^1H snimljeni pri vrtnji od 60 kHz za istraživanje intra- i inter-molekulskih ^{19}F - ^1H kontakata u kristalnoj rešetki POSA, što ukazuje na antiparalelno i "head to head" pakiranje u kristalnoj rešetki POSA [21].

Nadalje, utvrđene su kritične međumolekulske udaljenosti u kristalnoj rešetki [23]. Utvrđeno je da je antiparalelno pakiranje dvaju susjednih molekula zadržano u amorfnoj POSA na slici 9, što sugerira lokalizirani molekulski red [22].



Slika 9. Polarizacijski spektri 1D ^{19}F - ^{13}C potvrđuju nepostojanje pakiranja "head-to-head" u amorfnom posakonazolu [22].

U amorfnom su obliku odsutne interakcije koje povezuju antiparalelne parove u redove što rezultira poremećajem strukture, osiguravajući održivi mehanizam amorfizacije materijala kao što je prikazano na slici 10.



Slika 10. Shematska ilustracija mehanizma pretvorbe kristalnog u amorfni oblik, otkrivenog pomoću spektroskopije NMR u čvrstom stanju [22].

2.3. Upotreba spektroskopije NMR u čvrstom stanju za kvantifikaciju

Kao što je poznato, NMR (u otopini i krutini) može dati informacije o relativnoj koncentraciji kemijske vrste — ali ako se eksperimentalni uvjeti pažljivo kontroliraju. Primarni zadatak spektroskopije NMR u čvrstom stanju u karakterizaciji farmaceutskih pripravaka je kvantitativna analiza promjena oblika aktivnih sastojaka lijekova. Budući da spektroskopija NMR u čvrstom stanju može dati informacije o heterogenim čvrstim tvarima, kvantitativni eksperimenti mogu se provesti na formuliranim sustavima lijekova; u rotore MAS moguće je umetnuti cijele tablete. Formulacije lijekova mogu koristiti kristalinične oblike aktivnih komponenti lijeka, npr. hidrat, dehidrat, sol, ko-kristalne oblike, kao i amorfne oblike, ovisno o željenoj stabilnosti i bioraspoloživosti. Fazne promjene, uključujući pretvorbe kristalnog u drugi kristalni ili amorfni oblik, te amorfno oblika u kristalni često se opažaju u proizvodnji lijekova i njihovom skladištenju [29,31].

Postoji velik broj različitih načina izvođenja kvantifikacijskih eksperimenata. Jedan od najpouzdanijih je korištenje unutarnjeg standarda, jer se tada mnogi čimbenici koji utječu na apsolutne intenzitete eliminiraju ili barem minimiziraju. Konvencionalne tehnike, uključujući PXRD i vibracijsku spektroskopiju dobro se koriste u svrhu kvantifikacije, ali imaju neka ograničenja [27]. Što se tiče difrakcijskih tehnika, svojstva kristalnih čestica, npr. orijentacija i veličina, mogu utjecati na kvantifikaciju. Primjerice, kada uzorci pokazuju preferiranu

orijentaciju umjesto nasumičnog rasporeda, to bi moglo doprinijeti intenzitetu difrakcije značajnije od ostalih usmjerenja budući da je intenzitet povezan s brojem atoma u određenoj ravnini.

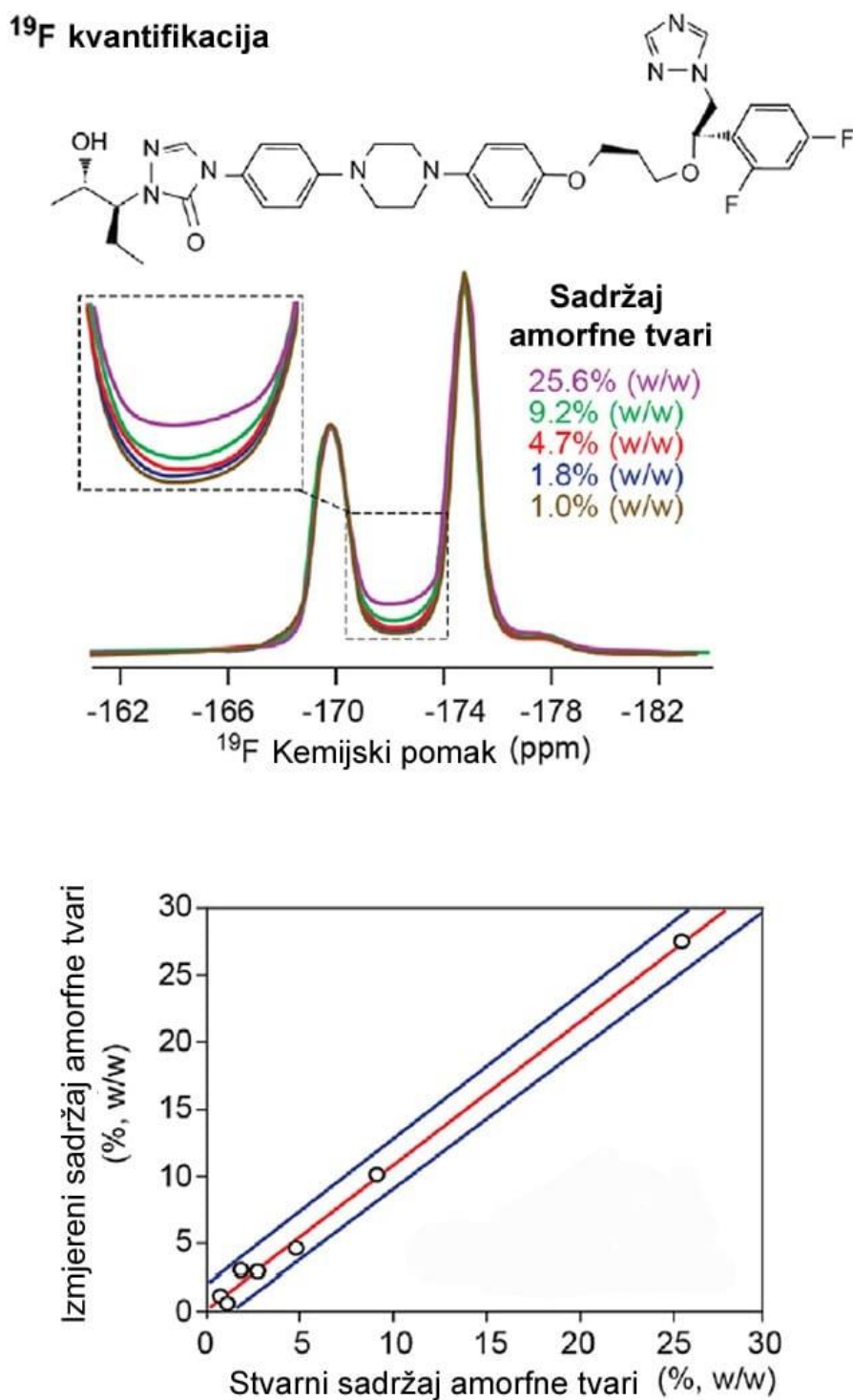
U karakterizaciji proizvedenih lijekova, rekristalizacijom aktivnih sastojaka mogu nastati kristalne čestice, koje imaju različite veličine od referentnih uzoraka. Vibracijska spektroskopija možda neće pokazati željenu rezoluciju za razlikovanje kristalnog i amornog oblika tvari, zbog čega je potrebna opsežna kemometrijska analiza za prepoznavanje malih promjena i poboljšanje pouzdanosti kvantifikacije [30].

Kao inherentno kvantitativna tehnika, spektroskopija NMR u čvrstom stanju često je korištena kao alat za određivanje kalibracijske krivulje za kalorimetriju, difrakciju i istraživanja Ramanovom spektroskopijom [26,32,35]. Kvantitativna analiza pomoću spektroskopije NMR u čvrstom stanju može se općenito podijeliti u dvije kategorije: integracijske i referentne metode. Omjer integriranih područja signala (u integracijskim metodama) predstavlja relativnu količinu pojedinačnih komponenti ako su NMR signali dobro razlučeni [34,35]. Referentni uzorci, ako su dostupni, često se koriste za kvantifikaciju putem spektralnog uklapanja (tzv. *spectral fitting*) koje ukratko podrazumijeva snimanje referentnih spektara pojedinačnih komponenti i njihovo dodavanje prilagođavanjem njihovog relativnog omjera da bi se slagali sa spektrom uzorka od interesa [25]. Spektroskopija NMR čvrstog stanja može se koristiti za kvantifikaciju jezgri koje su najbrojnije u farmaceutskim pripravcima, primjerice ^{13}C , ^1H , ^{35}Cl , ^{31}P i ^{19}F .

^1H ima veliku prirodnu zastupljenost (99,98%) i žiromagnetni omjer, što čini ove jezgre najosjetljivijim jezgrama za spektroskopiju NMR u farmaceutskim istraživanjima. Iako su jezgre ^1H najzastupljenije jezgre u ljekovitim spojevima, njihova kvantifikacija korištenjem spektroskopije NMR u čvrstom stanju je često neizvediva zbog nedostatka spektralne rezolucije. Za smanjenje širine linija signala razvijeno je više kvantitativnih tehnika NMR. Relativno jednostavan mehanizam za poboljšanje osjetljivosti i rezolucije u spektru ^1H je primjena brze vrtnje pod magičnim kutom. Rossini i suradnici su pokazali kako se pomoću tehnike MAS I vrtnji od 50 Hz može provesti kvantifikacija jezgri ^1H farmaceutskih pripravaka u čvrstom obliku (tablete). [28].

^{19}F ima 4 puta veći žiromagnetski omjer i 100 puta veću prirodnu zastupljenost od ^{13}C ,

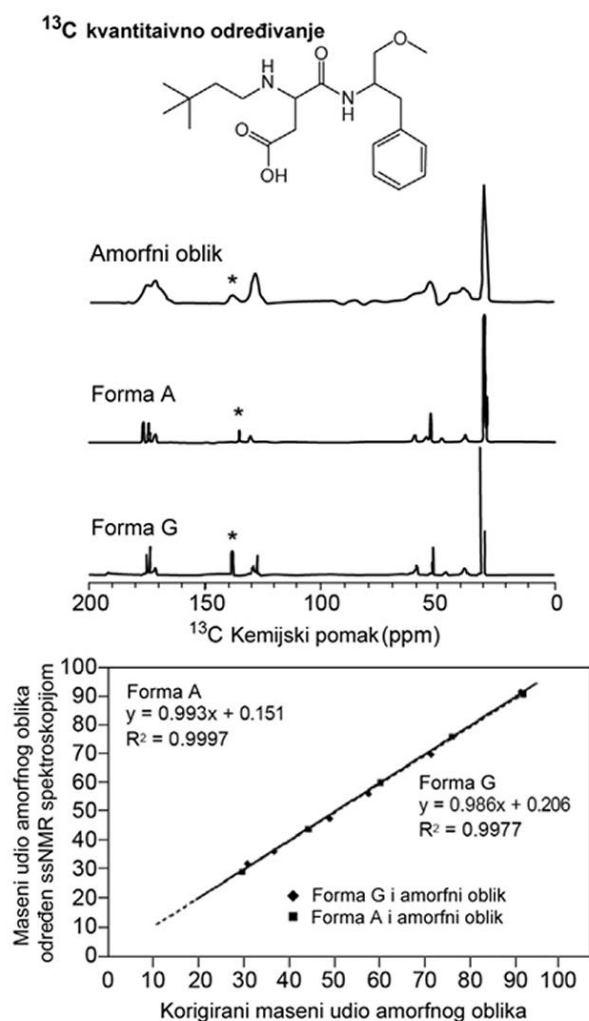
dajući osjetljivost veću za otprilike tri reda veličine. Atomi fluora postoje u oko 25% molekula lijekova na tržištu i uglavnom ih nema u farmaceutskim pomoćnim tvarima [33]. Stoga spektroskopija NMR u čvrstom stanju jezgri ^{19}F može istraživati lijekove koji sadrže fluor u maloj količini bez ometanja drugih komponenti u formulaciji. Jako je korisno kvantificirati kristalinični i amorfni sadržaj molekula lijeka koje sadrže ^{19}F , a prisutne su u tragovima [24]. U studiji potaknutih faznih transformacija posakonazola (POSA), Huang i sur. rabili su tehniku direktne polarizacije jezgri ^{19}F za kvantificiranje amornog oblika tvari u tabletama POSA korištenjem referentne metode kvantifikacije [24]. Sadržaji ^{19}F u amornom obliku tvari određeni spektroskopijom NMR u čvrstom stanju pokazali su linearnu korelaciju s izmjerenim omjerima mase pomoću niza amornih i kristaliničnih smjesa posakonazola, kao što je ilustrirano na slici 11.



Slika 11. Spektri ^{19}F dobiveni korištenjem tehnike direktne polarizacije i vrtnje pod magičnim kutom (^{19}F DP MAS) nekoliko kristalnih i amornih smjesa posakonazola s poznatim težinskim udjelom amornih tvari. Prikazana je analiza linearne regresije s pouzdanosti od 95% [24].

Granica detekcije (*Limit Of Detection*) određena je linearnom regresijskom analizom 1,7% w/w s razinom pouzdanosti od 95%. Spektroskopija NMR u čvrstom stanju jezgri ^{19}F pokazala je superiornu osjetljivost u otkrivanju i kvantifikaciji kontaminacije lijekova fluoropolimerom politetrafluoretilenom u količinama od samo 0,02% [35].

Kvantitativna metoda križne polarizacije uz vrtnju pod magičnim kutom za snimanje spektara jezgri ^{13}C CP MAS koristi se za kvantifikaciju polimorfa i određivanje postotka pretvorbe oblika aktivnih komponenti lijekova. Ovom tehnikom mogu se kvantificirati relativne količine polimorfa, hidrata, solvata, soli i amorfnih oblika aktivnih sastojaka u smjesama [36]. Offerdahl i sur. kvantificirali su količinu kristaličnog oblika neotama (forme A i G) u smjesama sa amorfnom formom, kao što je prikazano na slici 12, te su istražili utjecaj relaksacijskih svojstava na učinkovitost križne polarizacije polimorfa aktivnih komponenti lijekova [37].

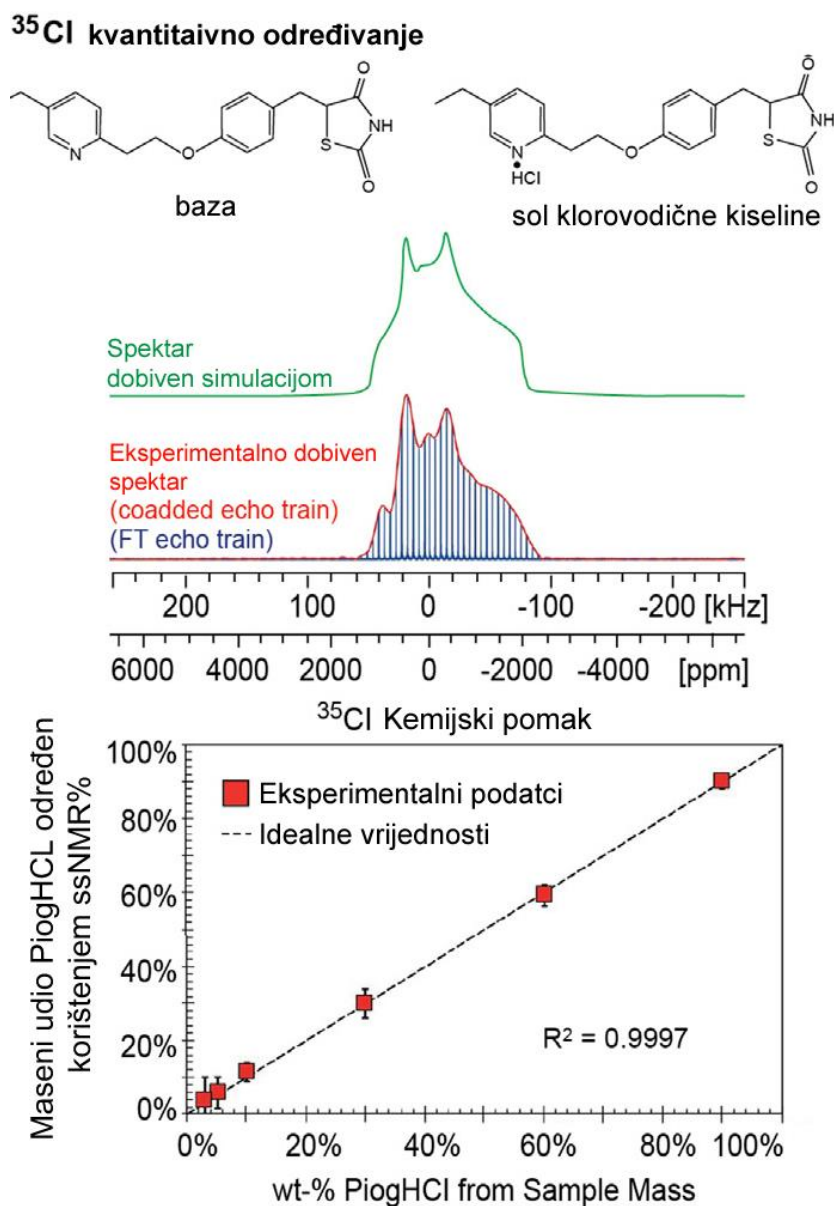


Slika 12. Kvantifikacija kristaličnih oblika neotama A i G u smjesama s amorfnim neotamom [37].

Autori su pokazali da dinamika križne polarizacije može utjecati na intenzitet dobivenog signala, pa stoga omjer intenziteta tih signala pri nultom vremenu kontakta predstavlja omjer količina polimorfa. U čvrstim tvarima, primjerice tabletama, polimorfi aktivnih sastojaka često pokazuju signale odvojene od signala pomoćnih tvari, što omogućuje kvantifikaciju transformacije polimorfa [33,34]. Spektroskopija NMR u čvrstom stanju jezgri ^{13}C obično se primjenjuje za kvantifikaciju faznih prijelaza do kojih dolazi tijekom obrade ljekovitih proizvoda [38]. Postojanje amorfnog sadržaja proizvedenog tijekom farmaceutске obrade i proizvodnje kristalične tvari također se može kvantificirati pomoću spektroskopije ^{13}C NMR u čvrstom stanju.

Prisutnost jezgri koje su specifične za aktivni sastojak nekog lijeka, primjerice ^{31}P i ^{35}Cl , otvara dodatne mogućnosti za kvantifikaciju pomoću spektroskopije NMR u čvrstom stanju. Izotop ^{31}P je 100% zastupljen u uzorku i ima receptivnost gotovo četiri puta veću od one ^{13}C . Korišten je ^{31}P ssNMR za kvantifikaciju amorfnog i kristalnog sadržaja API MK-A, spoja koji sadrži fosfor i koristi se za validaciju kvantitativne metode Ramanove spektroskopije [39].

Naspram tome, pokazano je da je tehnika ^{35}Cl ssNMR korisna za identifikaciju ljekovitih tvari koje sadrže klor, kao i za karakterizaciju konverzije ionske soli aktivnog sastojka lijeka u neutralni oblik-proces poznat kao disproporcioniranje [41]. ^{35}Cl je kvadrupolarna jezgra ($I = 3/2$), a ^{35}Cl NMR spektri (tvari u čvrstom stanju) obično imaju široke signale zbog anizotropnih i kvadrupolnih interakcija. Hirsh i sur. primijenili su tehniku 1D ^{35}Cl NMR za kvantifikaciju disproporcioniranja soli HCl u obliku PiogHCl, kao što je prikazano na slici 13 [40]. Ovaj rad predstavlja prvu primjenu kvantifikacije pomoću spektroskopije NMR čvrstog stanja jezgri ^{35}Cl .



Slika 13. Spektri ^{35}Cl NMR čiste soli pioglitazona HCl (PIO-HCl) u statičkim uvjetima uzorka (crvena i plava) i odgovarajuća analitička simulacija (zeleno). Grafički prikaz PIO-HCl w/w % određen spektroskopijom NMR u čvrstom stanju u odnosu na težinski postotak po masi [40].

§ 3. LITERATURNI IZVORI

1. W.J. Hennel, J. Klinowski, J. Klinowski (Editor), *Magic Angle Spinning: A Historical Perspective*, Springer, 2005, p. 1
2. Z. Zhang, A. Oss, M.L. Org, A. Samoson, M. Li, H. Tan, Y. Su, J. Yang, *J. Phys. Chem. Lett.* 11 (19) (2020) 8077.
3. A.E. Bennett, C.M. Rienstra, M. Auger, K.V. Lakshmi, R.G. Griffin, *J. Chem. Phys.* 103 (1995) 6951.
4. Melinda J. Duer, *Introduction to Solid-State NMR Spectroscopy*, Blackwell Science, Oxford, 2004, str. 60.
5. H.R. S, L.E. Hahn, *Phys. Rev.* 128 (1962) 2042.
6. Melinda J. Duer, *Introduction to Solid-State NMR Spectroscopy*, Blackwell Science, Oxford, 2004, str. 104.
7. A.M. Healy, Z.A. Worku, D. Kumar, A.M. Madi, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 117 (2017) 25.
8. J. Bauer, S. Spanton, R. Henry, J. Quick, W. Dziki, W. Porter, J. Morris, *Pharmaceut. Res.* 18 (2001) 859.
9. U.S.D.o.H.a.H. Services, F.a.D. Administration, C.f.D.E.a.R. CDER, Guidance for industry ANDAs: pharmaceutical solid polymorphism food and drug administration, 2007. <https://www.fda.gov/media/71375/download> (datum pristupa 01.01.2023.)
10. Dunitz, J. D., Bernstein, J. (1995) Disappearing polymorphs. *Acc. Chem. Res.* 28: 193–200
11. Harris, R. K., Hodgkinson, P., Larsson, T., Muruganatham, A. Quantification of bambuterol hydrochloride in a formulated product. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 38 (2005) 858–864
12. Portieri, A. Solid state NMR of sulfa-drugs, Doktorski rad, University of Durham, 2001
13. Harris, R. K., Jackson, P. High-resolution ^1H and ^{13}C NMR of solid 2-aminobenzoic acid. *J. Phys. Chem. Solids* 48 (1987) 813–818
14. B. Elena, G. Pintacuda, N. Mifsud, L. Emsley, *J. Am. Chem. Soc.* 128 (2006) 9555.
15. M. Baias, C.M. Widdifield, J.N. Dumez, H.P.G. Thompson, T.G. Cooper, E. Salager, S. Bassil, R.S. Stein, A. Lesage, G.M. Day, L. Emsley, *Phys. Chem.* 15 (2013) 8069.
16. E. Salager, G.M. Day, R.S. Stein, C.J. Pickard, B. Elena, L. Emsley, *J. Am. Chem. Soc.* 132 (2010) 2564.

17. J.K. Harper, R. Iulicci, M. Gruber, K. Kalakewich, *Cryst. Eng. Comm.* 15 (2013) 8693.
18. K. Kalakewich, R. Iulicci, K.T. Mueller, H. Eloranta, J.K. Harper, *J. Chem. Phys.* 143 (2015) 3-4.
19. R.K. Harris, *Solid State Sci.* 6 (2004) 1025.
20. N. Kaur, V.G. Young Jr., Y. Su, R. Suryanarayanan, *Mol. Pharm.* 17 (2020) 3915.
21. X. Lu, Y. Tsutsumi, C. Huang, W. Xu, S.R. Byrn, A.C. Templeton, A.V. Buevich, J.P. Amoureux, Y. Su, *Phys. Chem.* 22 (2020) 13160.
22. X. Lu, C. Huang, M. Li, D. Skomski, W. Xu, L. Yu, S.R. Byrn, A.C. Templeton, Y. Su, *J. Phys. Chem. B* 124 (2020) 5271.
23. X. Lu, M. Li, C. Huang, M.B. Lowinger, W. Xu, L. Yu, S.R. Byrn, A.C. Templeton, Y. Su, *Mol. Pharm.* 17 (2020) 2585.
24. C.B. Huang, G. Klinzing, A. Procopio, F.Y. Yang, J. Ren, R. Burlage, L. Zhu, Y.C. Su, *Mol. Pharm.* 16 (2019) 825.
25. S.J. Byard, S.L. Jackson, A. Smail, M. Bauer, D.C. Apperley, *J. Pharm. Sci.* 94 (2005) 1321.
26. G.A. Stephenson, R.A. Forbes, S.M. Reutzel-Edens, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 48 (2001) 67.
27. D.A. Hirsh, A.V. Wijesekara, S.L. Carnahan, I. Hung, J.W. Lubach, K. Nagapudi, A.J. Rossini, *Mol. Pharm.* 16 (2019) 3121.
28. J.F. Willart, M. Descamps, *Mol. Pharm.* 5 (2008) 905.
29. C.J. Strachan, T. Rades, K.C. Gordon, J. Rantanen, *J. Pharm. Pharmacol.* 59 (2007) 179.
30. G.G. Zhang, D. Law, E.A. Schmitt, Y. Qiu, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 56 (2004) 371.
31. R. Lefort, A. De Gusseme, J.F. Willart, F. Danede, M. Descamps, *Int. J. Pharm.* 280 (2004) 209.
32. J.P. Sheskey, G.W. Cook, G. Golin, *Handbook for Pharmaceutical Excipients*, Pharmaceutical Press, 2017.
33. R. Tinmanee, S.C. Larsen, K.R. Morris, L.E. Kirsch, *J. Pharmaceut. Biomed. Anal.* 146 (2017) 29.
34. C. John, W. Xu, L. Lupton, P. Harmon, *Pharmaceut. Res.* 30 (2013) 1628.
35. T.N. Pham, C.J. Day, A.J. Edwards, H.R. Wood, I.R. Lynch, S.A. Watson, A.S. Bretonnet, F.G. Vogt, *J. Pharmaceut. Biomed. Anal.* 54 (2011) 401.
36. R. Suryanarayanan, T.S. Wiedmann, *Pharm. Res. (N.Y.)* 7 (1990) 184.

37. T.J. Offerdahl, J.S. Salsbury, Z. Dong, D.J. Grant, S.A. Schroeder, I. Prakash, E.M. Gorman, D.H. Barich, E.J. Munson, *J. Pharm. Sci.* 94 (2005) 2591.
38. T. Virtanen, S.L. Maunu, *Int. J. Pharm.* 394 (2010) 18.
39. B.W. Wabuye, S. Sotthivirat, G.X. Zhou, J. Ash, S.S. Dhareshwar, *J. Pharmaceut. Sci.* 106 (2017) 579.
40. D.A. Hirsh, Y.C. Su, H.C. Nie, W. Xu, D. Stueber, N. Variankaval, R.W. Schurko, *Mol. Pharm.* 15 (2018) 4038.
41. P. Guerrieri, L.S. Taylor, *Pharm. Res. (N.Y.)* 26 (2009) 2015.