

Zaznava polimorfizma z jedrsko kvadrupolno resonanco

V. Jazbinšek¹, J. Pirnat¹, Z. Trontelj¹, Z. Lavrič², S. Srčič²

¹Inštitut za matematiko, fiziko in mehaniko, Ljubljana (IMFM)

²Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo (UL-FFA)

vojko.jazbinsek@imfm.si

ERK 2017, 25 Sep. 2017

- Cilj tega dela je pokazati uporabnost jedrske kvadrupolne rezonančne (JKR) pri nedestruktivnem in zanesljivem odkrivanju različnih polimorfov v aktivnih farmacevtsih sestavinah (AFS).
- Začel bom s kratkim pregledom metod, ki jih lahko uporabimo za določanje in/ali potrditev poliformizma v AFS.
- Nadaljeval bom z opisom metode JKR na dušikovih ^{14}N jedrih, ki se nahajajo v velikem številu organskih in anorganskih spojin.
- Sledil bo podrobni opis rezultatov, ki smo jih dobili na antibakterijskem zdravilu sulfanilamid.
- Razprava in zaključki.

- Polimorfizem je pojav, ko ima lahko določena trdna snov več kot eno kristalno strukturo. Polimorfizem je pomembna lastnost na področju farmacije, tako pri razvoju novih aktivnih farmacevtskih sestavin (AFS) kot tudi v že uveljavljenih farmacevtskih izdelkih.
- Obstaja več metod
 - Rentgenska struktturna analiza (RSA),
 - diferenčna termična analiza (DTA)
 - in razne spektroskopske metode kot so infra rdeča (IR), Ramanska in radio-frekvenčne (RF) metode,

ki se uporabljajo za določitev in/ali potrditev pojava polimorfizma med procesom kristalizacije pri razvoju novih AFS, kakor tudi med proizvodnjo in skladiščenjem zdravil.

- Zlati standard za določitev in potrditev polimorfizma v farmacevtskih produktih je RSA, saj je najprimernejša z vidika same definicije polimorfizma. Vendar pa običajno zahteva posebno pripravo vzorca in je tako manj primerna za preverjanje morebitnega pojava polimorfizma med samo proizvodnjo zdravil.

- Med raziskavami nekaterih AFS v različnih farmacevtskih izdelkih ter pri odkrivanju nekaterih ponarejenih zdravil v zadnjih desetih letih smo opazili, da lahko z jedrsko kvadrupolno resonanco dušika (JKR ^{14}N) zanesljivo in nedestruktivno določimo prisotnost različnih polimorfnih oblik [1-4].
- V tem delu bom prikazal, kako JKR ^{14}N omogoča učinkovito zaznavo polimorfizma v antibakterijskem zdravilu sulfanilamid.

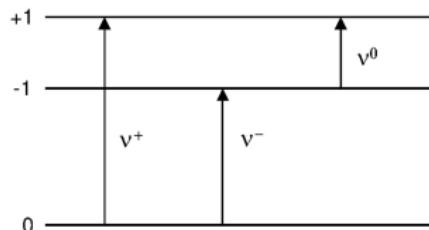
- [1] Z. Lavrič, J. Pirnat, J. Lužnik, U. Puc, Z. Trontelj, S. Srčič, ^{14}N Nuclear Quadrupole Resonance Study of Piroxicam: Confirmation of New Polymorphic Form V, *J.Pharm. Sci.* **104**: 1909-1919 (2015)
- [2] J. Lužnik, J. Pirnat, J. Pirnat, V. Jazbinšek, Z. Lavrič, V. Žagar, S. Srčič, J. Seliger, Z. Trontelj, ^{14}N Nuclear Quadrupole Resonance Study of Polymorphism in Famotidine, *J. Pharm. Sci.* **103**: 2704-2709 (2014)
- [3] Z. Lavrič, J. Pirnat, J. Lužnik, J. Seliger, V. Žagar, Z. Trontelj, S. Srčič, Application of ^{14}N NQR to the study of piroxicam polymorphism, *J.Pharm. Sci.* **99**: 4857-4865 (2010)
- [4] J. Pirnat, J. Lužnik, V. Jazbinšek, V. Žagar, J. Seliger, T. M. Klapoetke, Z. Trontelj, ^{14}N NQR in the tetrazole family, *Chem. Phys.* **364**: 98-104 (2009)

Jedrska kvadrupolna resonanca (JKR)

- Jedrska kvadrupolna resonanca (JKR) je nedestruktivna, brezkontaktna radiofrekvečna (RF) spektroskopska metoda, ki je podobna bolj znani jedrski magnetni resonanci (JMR).
- Za razliko od JMR, lahko JKR prehode v jedrih zaznamo brez uporabe zunanjega magnetnega polja ("Zero Field MR").
- JKR temelji na električni interakciji med jedrom z električnim kvadrupolnim momentom ($\text{spin} \geq 1$) in notranjim gradientom električnega polja (GEP), ki ga povzročajo okoliški elektroni v kristalni mreži.
- GEP na mestu jedra v dani sestavini določajo predvsem valenčni elektroni, ki sodelujejo v vezeh z ostalimi sosednjimi jedri, zato je frekvenca, pri kateri se pojavi JKR prehod, točno določena za to substanco.
- JKR lahko merimo na trdnih vzorcih v svoji začetni obliki (praški, granulati, tablete ipd.), ki se lahko uporabijo celo v originalni embalaži, če le-ta ni v celoti kovinska.
- Za uporabo JKR so zanimiva jedra dušika ^{14}N (spin 1), saj se dušik nahaja v velikem številu tako organskih kot anorganskih spojin. Metoda je uporabna na področju farmacevtskih raziskav, pri nadzoru kvalitete proizvodnje in pri zaznavi prepovedanih snovi (eksplosivi, ponarejena zdravila, ipd., glej <http://www.conphirmer.com/> - EU FP7 Security project, Grant No. 261670)

JKR ^{14}N : energijski nivoji in dovoljeni prehodi

- ^{14}N jedra imajo spin $I=1$
- Tri frekvence JKR prehodov:
 $v^\pm = \frac{1}{4}Q_{cc}(3 \pm \eta)$, $v_0 = v^+ - v^- = \frac{1}{2}Q_{cc}\eta$,



so enolične za dano sestavino in zavisijo le od kvadrupolne sklopitevene konstante Q_{cc} in asimetričnega parametra η .

- Kvadrupolna sklopitevna konstanta $Q_{cc} = \frac{e^2 q Q}{h}$ je sorazmerna
 - jedrskemu električnemu kvadrupolnemu momentu eQ in
 - maksimalni komponenti $eq = q_{zz}$ tenzorja gradienta električnega polja, kjer je e osnovni naboj in h Planckova konstanta.
- Asimetrični parameter je definiran kot $\eta = |q_{xx} - q_{yy}|/q$.
- Q_{cc} in η lahko izračunamo, če poznamo dve od zgornjih frekvenc.

Polimorfizem v antibakterijskem zdravilu sulfanilamid

- Tri znane polimorfne oblike α , β in γ
- in dva kemijsko neekvivalentna ^{14}N atoma:

N(1) – para amino dušik

N(2) – sulfonamidni dušik

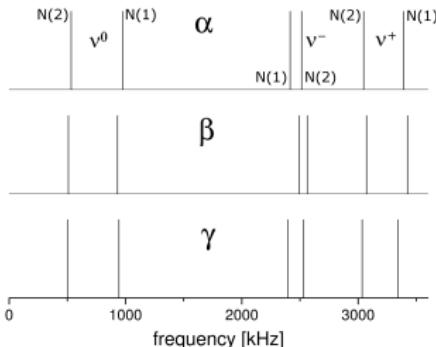
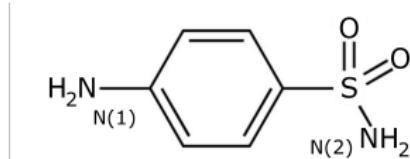
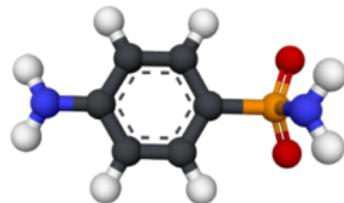
- dajo dva seta treh frekvenc (v^+ , v^- , v^0), ki so različne za vsak polimorf.

- Polimorfni obliki α in β smo dobili s kristalizacijo komercialno dostopnega sulfanilamida (Sigma-Aldrich) v

- i) izoamilnem ali n-butilnem alkoholu za α
- ii) in etilnem alkoholu za β polimorf

Pri $T > 390\text{ K}$ ti dve polimorfni obliki pretvorita v γ polimorf.

- Vsi trije polimorfni so stabilni pri sobni T .



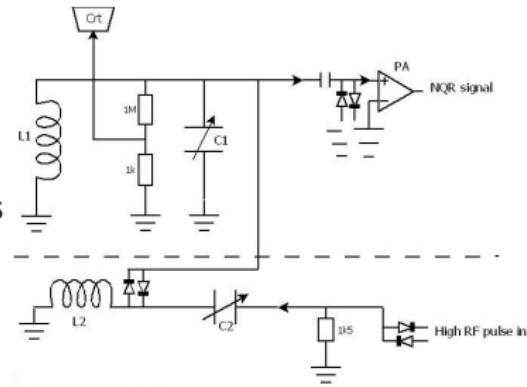
JKR frekvence ^{14}N v sulfanilamidu.

NQR spektrometer

Uporabili smo standardni sunkovni JKR spektrometer, ki ga sestavljata

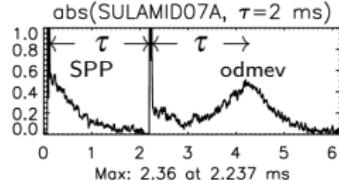
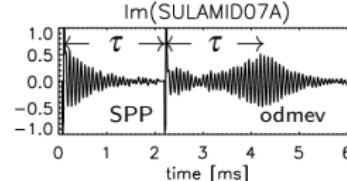
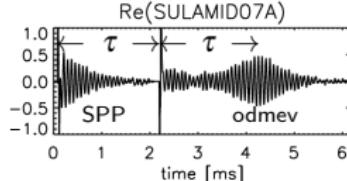
- dva uglašena sklopljena LC kroga:

- ❶ z vzorcem v tuljavi L1, predajačevalnikom in sprejemnikom
- ❷ s "step up" tuljavo L2, ki je povezana s
 - sunkovno RF programsko nastavljivo enoto (Spin Core)
 - in RF ojačevalnik (Tomco)



Celotni spektrometer upravljamo preko osebnega računalnika.

Tipična meritev: začetni RF sunek ustvari signal proste precesije (SPP), sledi RF sunek v času τ , ki ustvari odmev v času $\Delta t = \tau$.

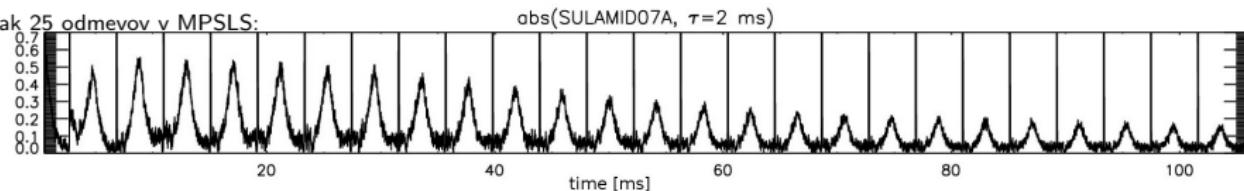


Multi-pulse spin-locking sekvenca (MPSLS) [5]

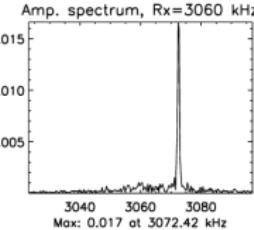
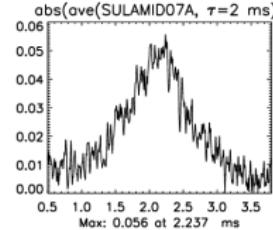
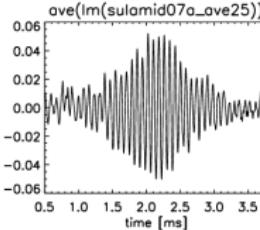
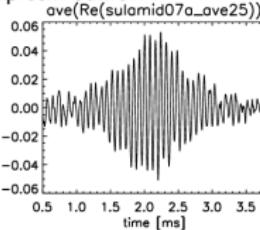
Za izboljšanje S/N in hitrejše merjenje, smo uporabili MPSLS $t_\varphi - (\tau - t_{\varphi+90} - \tau)_n$:

- t_φ je trajanje začetnega RF sunka ($\pi/2$ -sunek v JMR), ki generira SPP
- $t_{\varphi+90}$ je trajanje sunka, ki oblikuje odmev (π -sunek v JMR), kjer (90) označuje 90° fazni zamik glede na prejšnji t_φ sunek
- τ je časovni zamik med t_φ in prvim $t_{\varphi+90}$ sunkom. To je tudi čas med danim $t_{\varphi+90}$ sunkom in naslednjim vrhom odmeva.
- n je celotno število $t_{\varphi+90}$ sunkov v MPSLS sekvenci.

Vlak 25 odmevov v MPSLS:



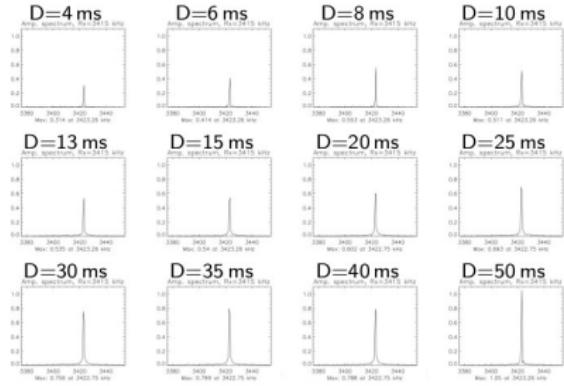
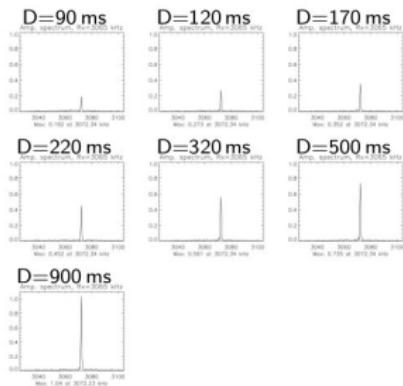
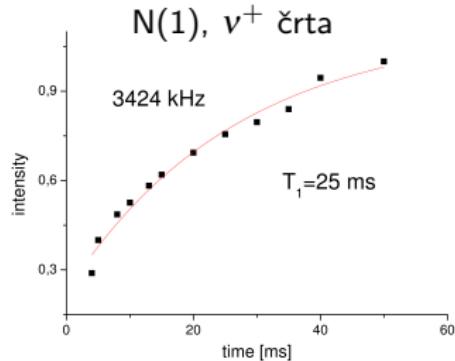
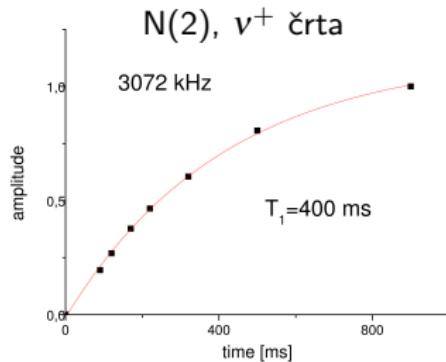
Povprečni odmev:



[5] R. A. Marino, S. M. Klainer, Multiple spin echoes in pure quadrupole resonance, *J. Chem. Phys.* **67**: 3388–3389 (1977)

Spinsko-mrežni relaksacijski čas T_1 za β polimorf

Meritve, kjer povečujemo zamik (D) med zaporednimi MPSLS.



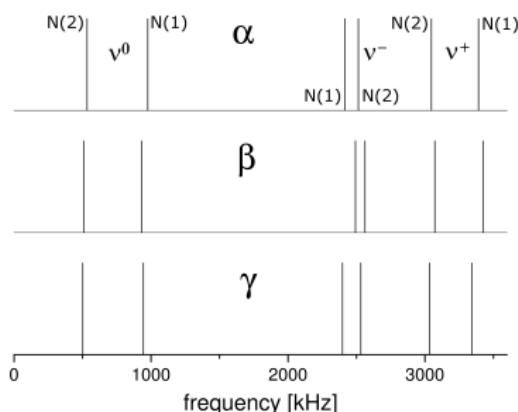
Pregled rezultatov

polimorf	atom	v^+ [kHz]	v^- [kHz]	v^0 [kHz]	Q_{cc} [kHz]	η	T_1 [ms]
α	N(1)	3391	2415	976	3871	0.50	25
	N(2)	3047	2514	533	3707	0.29	400
β	N(1)	3424	2493	931	3945	0.47	25
	N(2)	3072	2563	509	3757	0.27	400
γ	N(1)	3342	2398	944	3827	0.49	25
	N(2)	3034	2532	502	3711	0.27	25

JKR ^{14}N parametri za α , β in γ polimorfe v sulfanilamidu pri sobni temperaturi:

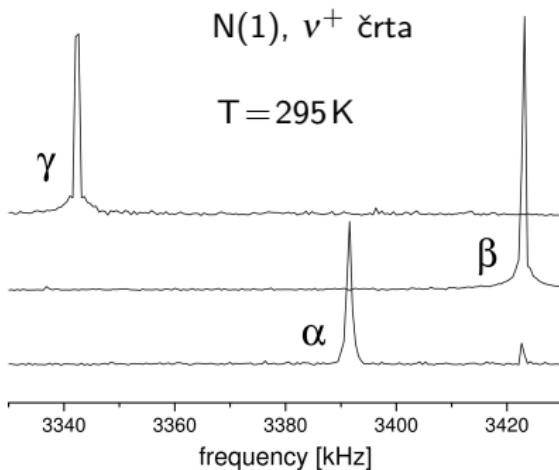
- frekvence prehodov (v^+ , v^- , v^0 ,)
- jedrska kvadrupolna sklopitvena konstanta Q_{cc}
- asimetrični parameter η in
- spinsko-mrežni relaksacijski čas T_1

Zgornja vrstica se nanaša na atom N(1) in spodnja na atom N(2) v molekuli sulfanilamida.



JKR ^{14}N frekvence prehodov v sulfanilamidu.

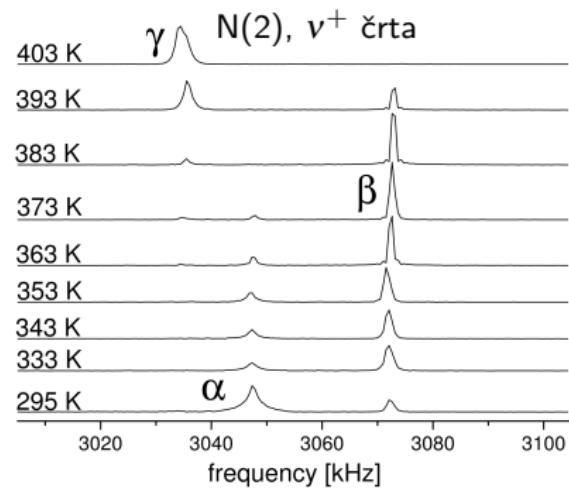
Rezultati



JKR spektri za dušikov atom (N1) za najvišjo frekvenco v^+ :

- 3391 kHz for α ,
- 3424 kHz for β in
- 3342 kHz for γ polimorf.

Na krivulji, ki kaže rezultate meritev na polimorfu α , lahko opazimo prisotnost primesi polimorfa β v vzorcu.



JKR ^{14}N spektri dušika N(2) ($v^+ \text{ črta}$) za začetni vzorec polimorfa α (s primesjo β). Vzorec sulfanilamida smo greli pri različnih temperaturah, ki so označene na levi strani krivulj, ki predstavljajo rezultate JKR meritev. Pred vsako meritvijo smo vzorec najprej ohladili nazaj na sobno temperaturo 295 K.

Razprava in zaključki

- Rezultati kažejo, da se JKR ^{14}N frekvence razlikujejo za vsako polimorfno obliko v sulfanilamidu. Razlikujejo se tudi za oba dušikova atoma N(1) in N(2).
- JKR ^{14}N je tako zelo učinkovita nedestruktivna metoda za zaznavanje pojava polimorfizma, ki jasno razloči med polimorfnimi oblikami.
- Prednost pred ostalimi metodami kot so RSA, JMR, Ramanska in IR spektroskopija je v tem, da za JKR ne potrebujemo posebne predpriprave vzorca. JKR lahko merimo na trdnih vzorcih v svoji začetni obliki (praški, granulati, tablete ipd.), ki se lahko uporabijo celo v originalni embalaži, če le-ta ni v celoti kovinska.
- Ko enkrat poznamo vse sete JKR ^{14}N frekvenc za vse polimorfne oblike, je potrebno za identifikacijo posameznega polimorfa zaznati le eno spektralno črto (ponavadi tisto z največjim razmerjem S/N).
- Metoda je tudi dovolj hitra, saj je za tak test v sulfanilamidu dovolj le nekaj minut.
- V tej raziskavi smo pokazali učinkovito uporabo JKR ^{14}N pri hitrem, nedestruktivnem in zanesljivem ugotavljanju pojava polimorfizma v trdnih farmacevtskih vzorcih, ki vsebujejo dušik. Poleg RSA, ki predstavlja primarno metodo, bi JKR lahko igrala vlogo hitrega sekundarnega etalona za določanje polimorfizma.