

Zaznava polimorfizma z jedrsko kvadrupolno resonanco

Vojko Jazbinšek¹, Janez Pirnat¹, Zvonko Trontelj¹, Zoran Lavrič², Stane Srčič²

¹Inštitut za matematiko fiziko in mehaniko, Ljubljana

²Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani

E-pošta: vojko.jazbinsek@imfm.si

Detection of polymorphism with nuclear quadrupole resonance

To demonstrate good and reliable selective property of ¹⁴N nuclear quadrupole resonance (¹⁴N NQR) spectroscopy and its applicability in determination of polymorphism, a study of sulfanilamide polymorphism was undertaken. Three known polymorphs of sulfanilamide were examined. Two sets of three ¹⁴N NQR transition frequencies, corresponding to two different nitrogen sites in the crystal structure for each of three polymorphs, were found at room temperature. One of the three ¹⁴N NQR frequencies is recognized to be enough to determine the polymorph. This quick and reliable proof of polymorphism appearance could become a secondary standard in determination and/or confirmation of polymorphism, especially in solid drugs containing nitrogen.

1 Uvod

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 [1, 2]. Obstaja več metod, večinoma so to spektroskopske (Rentgenska strukturalna analiza (RSA), infra rdeča (IR), Ramanska, radiofrekvenčne (RF) spektroskopske metode), ki se poleg diferencialne termične analize (DTA) 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 ¹⁴N) učinkovito in nedestruktivno določimo prisotnost različnih polimorfnih oblik AFS [3, 4, 5, 6]. JKR je primerna za proučevanje tako statičnih in dinamičnih lastnosti kot tudi za določitev pojava polimorfizma v trdnih snoveh s kvadrupolnimi jedri, kot je na primer dušik ¹⁴N, ki se nahaja v veliko organskih in anorganskih spojinah.

Cilj tega dela je bil pokazati uporabnost JKR ¹⁴N RF spektroskopije pri nedestruktivnem in zanesljivem odkrivanju različnih polimorfov in rezultate primerjati z izsledki drugih metod. Zato smo izbrali znano antibakterijsko zdravilo sulfanilamid, ki ima tri znane polimorfe α , β in γ , za katero so že bile narejene raziskave z RSA, IR, DTA, jedrsko magnetno resonanco (JMR) na ¹H, ¹³C, ¹⁵N vključno z relaksacijskimi meritvami in preliminarnimi raziskavami z JKR ¹⁴N [7, 8, 9, 10, 11, 12].

2 Metoda

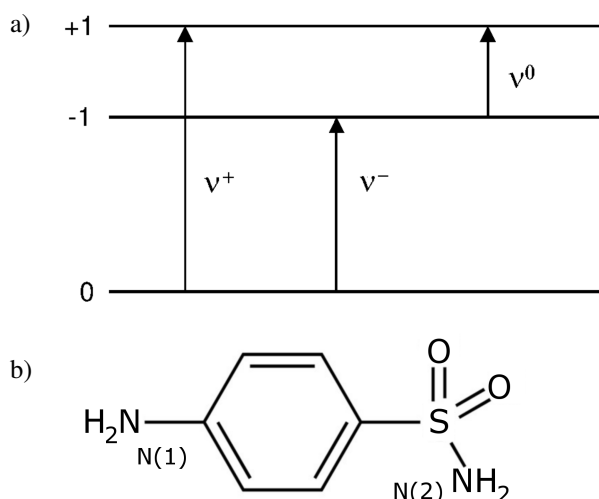
JKR je popolnoma brezkontaktna nedestruktivna RF spektroskopska metoda, ki temelji na električni interakciji med jedrom z električnim kvadrupolnim momentom in notranjim gradientom električnega polja, ki ga povzročajo okoliški elektroni v kristalni mreži. Jedra ¹⁴N imajo spin $I=1$ in posledično električni kvadrupolni moment, ki je pogoj za kvadrupolno interakcijo. Na sliki 1a so prikazani JKR energijski nivoji ¹⁴N in dovoljeni prehodi med njimi, ustrezne frekvence so enake [13, 14]:

$$\nu^+ = \frac{e^2qQ}{4h}(3+\eta), \nu^- = \frac{e^2qQ}{4h}(3-\eta), \nu^0 = \frac{e^2qQ}{2h}\eta.$$

Tu je $e^2qQ/h = Q_{cc}$ kvadrupolna sklopitvena konstanta, kjer je eQ električni kvadrupolni moment jedra, $eq = q_{zz}$ je maksimalna komponenta tenzorja gradienta električnega polja, e je naboj elektrona, h Planckova konstanta in $\eta = |q_{xx} - q_{yy}|/q$ asimetrijski parameter.

V molekuli sulfanilamida (slika 1b) sta dva kemijsko neekvivalentna atoma dušika (para amino N(1) in sulfonamidni N(2) dušik), ki dasta dva seta treh frekvenc (ν^+ , ν^- in ν^0), ki ustrezajo prehodom med energijskimi nivoji in so različne za vsako od polimorfnih oblik (slika 2).

Vse tri polimorfne oblike (α , β , γ) sulfanilamida smo dobili s kristalizacijo komercialno dostopnega sulfanilamida (Sigma-Aldrich): i) v izoamilnem ali n-butilnem alkoholu za polimorf α in v ii) etilnem alkoholu za polimorf β . Pri temperaturah nad 390 K se ta dva polimorfa pretvorita v polimorf γ . Monotropna temperatura prehoda iz polimorfa α v γ obliko (pri približno 380 K) je malce nižja kot pri prehodu iz β v γ obliko (pri približno 385 K) [15, 16]. Tretji polimorf γ smo pripravili s preprostim nadzorovanim približno pol urnim gretjem polimorfa β na 403 K. Vsi trije polimorfi so stabilni pri sobni temperaturi. V našem primeru pripravljeni polimorf α



Slika 1: a) Kvadrupolni energijski nivoji in dovoljeni prehodi za jedra s spinom $I=1$. b) Strukturna formula sulfanilamida.

ni bil povsem čist, saj smo zaznali primesi polimorfa β , kar se kaže v spodnjih krivuljah na slikah 3 in 4. Polimorf β , ki smo ga pripravili sami, je bil čist. Komercialni začetni sulfanilamid je bil tudi čist polimorf β , kar smo potrdili z JKR ^{14}N meritvami. Uporabili smo standardni sunkovni JKR spektrometer. Celotni spektrometer upravljamo z osebnim računalnikom (PC), kjer opravimo tudi analizo podatkov. Pri meritvah smo uporabili "multi-pulse spin-locking sequence" (MPSLS) [17] $\varphi_0 - (\tau - \psi_{90} - \tau)_n$, kjer je n število ponovitev osnovne RF sunkovne sekvence $(\tau - \psi_{90} - \tau)$. φ_0 je uvodni sunek, ki ustvari signal proste precesije (FID-free induction decay), njegova dolžina je izbrana tako, da dobimo optimalni signal. ψ_{90} sunki ustvarijo odmeve in so fazno zamaknjeni za 90° relativno na prejšnji φ_0 sunek.

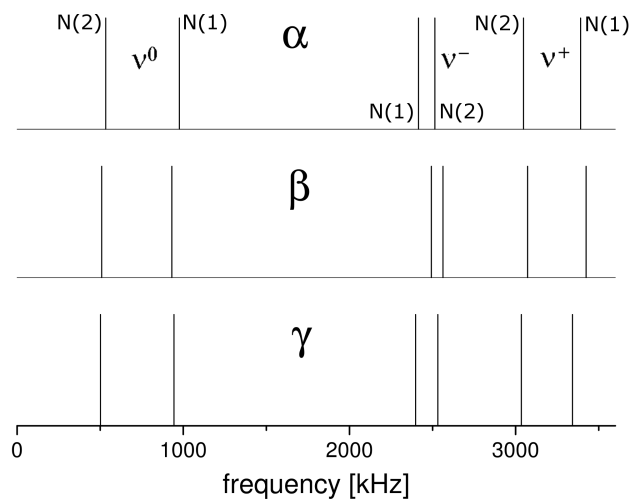
3 Rezultati

V tabeli 1 in sliki 2 so prikazane izmerjene JKR ^{14}N frekvence prehodov in spinsko-mrežni relaksacijski časi T_1 za vse tri polimorfe.

Kristalne strukture teh polimorfov so i) ortorombska s prostorsko grupo P_{bca} ($a=5.65 \text{ \AA}$, $b=18.51 \text{ \AA}$, $c=14.79 \text{ \AA}$) za polimorf α , ii) monoklinska s prostorsko grupo $P2_1/c$ ($a=9.00 \text{ \AA}$, $b=9.01 \text{ \AA}$, $c=10.05 \text{ \AA}$, $\beta=111.5^\circ$) za polimorf β in iii) monoklinska s prostorsko grupo $P2_1/c$ ($a=7.95 \text{ \AA}$, $b=12.94 \text{ \AA}$, $c=7.79 \text{ \AA}$, $\beta=106.5^\circ$) za polimorf γ [7, 8, 9, 10].

Po pričakovanju smo za vsako polimorfno obliko dobili dve skupini treh JKR ^{14}N frekvenc. Za hitrejše povprečenje in izboljšanje razmerja med signalom in šumom (S/N) smo uporabili MPSLS [17]. Za črte s kratkima T_1 in T_2 smo v vsaki posamezni sekvenci uporabili le 5 odmevov s frekvenco ponavljanja (10/s), medtem ko smo za črte z daljšima T_1 in T_2 uporabili do 50 odmevov s časom ponavljanja (2/s). Na sliki 3 so prikazani tipični rezultati JKR ^{14}N v frekvenčni domeni.

DTA meritve na sulfanilamidu [15, 16] so pokazale,



Slika 2: JKR ^{14}N frekvence prehodov za polimorfe α , β and γ v sulfanilamidu.

da polimorfa α in β preideta v polimorf γ pri višjih temperaturah (380K za prehod α v γ in 385K za prehod β v γ). Z JKR ^{14}N smo poskusili slediti temu prehodu: vzorec sulfanilamida α s primesjo polimorfa β smo greli v nadzorovanih pogojih v korakih po 10 K pred JKR meritvami. Konstantno temperaturo smo vzdrževali približno 60 minut. Po vsakem koraku smo vzorec ohladili nazaj na sobno temperaturo in posneli JKR ^{14}N spekter. Rezultati, ki so prikazani na sliki 4, kažejo, kako začetni polimorf α s primesjo β z višanjem temperature prehaja najprej v polimorf β in kasneje v polimorf γ . Merili smo JKR spektre dušika N(2), ker ima ta atom JKR črte za vse tri polimorfe bliže skupaj v primerjavi z dušikom N(1). Tako smo lahko uporabil le en osnovni sunek φ_0 za vse tri N(2) črte, kar skrajša čas merjenja.

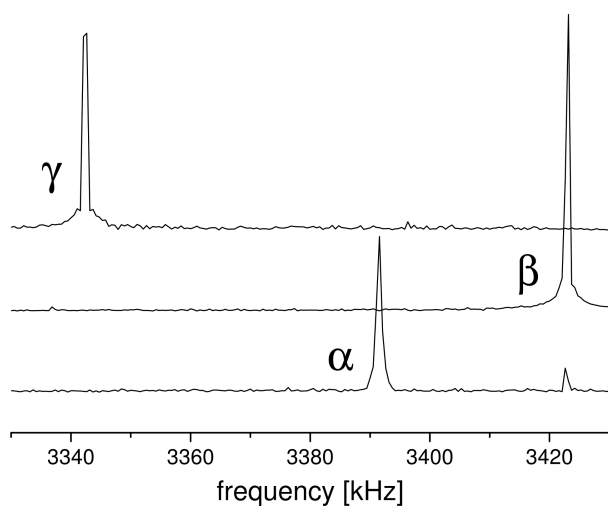
Na spodnji krivulji slike 4 vidimo, da imamo na začetku polimorf α z majhno primesjo polimorfa β . Z višanjem temperature po korakih pred vsako od meritev opazimo prehajanje polimorfa α v polimorf β . Pri višjih temperaturah polimorf β preide v polimorf γ . Ti rezultati kažejo, da v sulfanilamidu polimorf α ne preide v polimorf γ direktno, ampak preko polimorfa β .

4 Razprava in zaključki

RSA je pokazala, da se kristalne strukture vseh treh polimorfov v sulfanilamidu razlikujejo predvsem v dihedralnem kotu med C(3)-C(4)-S(1)-N(2) atomi [11], zato je bil za nas izziv ugotoviti, kaj pokažeta RF spektroskopski metodi JMR in JKR. Prejšnje raziskave [11] JMR ^{13}C kombinirane z vrtenjem pod magičnim kotom so pokazale spremembe v kemijskem premiku za atome C(2)/C(6) v fenilnem obroču vseh treh polimorfov: $\Delta=2.2 \text{ ppm}$ za α , $\Delta=4.8 \text{ ppm}$ za β in $\Delta=2.4 \text{ ppm}$ za γ . V isti raziskavi [11] so izmerili magični kot vrtenja v JMR na ^{15}N v vzorcih z obogatenim deležem ^{15}N in opazili, da le dušik N(2) kaže različne kemijske premike za vse tri polimorfe: $\Delta=-288.8 \text{ ppm}$ za α , $\Delta=284.1 \text{ ppm}$ za β in $\Delta=280.6 \text{ ppm}$ za γ . Opazili so tudi razlike v spinsko-mrežnem re-

Tabela 1: Izmerjene JKR ^{14}N frekvence prehodov, spinsko-mrežni relaksacijski čas T_1 , jedrske kvadrupolne sklopitvene konstante Q_{cc} in asimetrijski parametri η za polimorfe α , β and γ v sulfanilamidu na sobni temperaturi. Zgornje vrstice pripadajo N(1) in spodnje N(2) atomom v molekuli sulfanilamida.

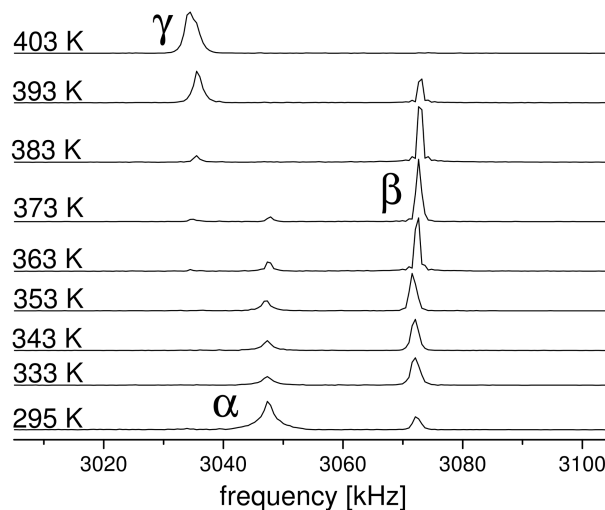
polimorf	atom	ν^+ [kHz]	ν^- [kHz]	ν^0 [kHz]	Q_{cc} [kHz]	η	T_1 [ms]
α	N(1)	3391	2415	976	3871	0.50	25
	N(2)	3047	2514	533	3707	0.29	400
β	N(1)	3424	2493	931	3945	0.47	25
	N(2)	3072	2563	509	3757	0.27	400
γ	N(1)	3342	2398	944	3827	0.49	25
	N(2)	3034	2532	502	3711	0.27	25



Slika 3: JKR ^{14}N spektri dušika (N1) s frekvenco ν^+ za vse tri polimorfe sulfanilamida (3391 kHz za polimorf α , 3424 kHz za β in 3342 kHz za γ). Meritve smo naredili pri sobni temperaturi s približno enako količino vseh vzorcev (~ 4 g). Na krivulji, ki kaže rezultate meritev na polimorfu α , lahko opazimo prisotnost primesi polimorfa β v vzorcu.

laksacijskem času T_1 (JMR ^{15}N) za N(1) in N(2), kakor tudi za protonske T_1 in $T_{1\rho}$, kar odraža različno mobilnost molekul v vseh treh polimorfih sulfanilamida. Naši podatki meritev z JKR ^{14}N so zbrani v tabeli 1. Opazimo lahko, da so pri JKR ^{14}N resonančne frekvence različne za vsakega od polimorfov. Razlikujejo se tudi za dušika N(1) in N(2). Polega tega JKR ^{14}N spinsko-mrežni relaksacijski čas T_1 kaže na različno mrežno dinamiko v okolici dušikov N(1) in N(2) za polimorfa α in β , česar nismo zaznali pri polimorfu γ .

JKR ^{14}N tako predstavlja zelo učinkovito nedestruktivno analitično orodje za zaznavo pojavnosti polimorfizma, ki omogoča jasno razlikovanje med različnimi polimorfi. Prednost te metode v primerjavi z drugimi, kot so RSA, visokoločljiva JMR, Ramanska in IR spektroskopija je v tem, da pri JKR spektroskopiji ne potrebujemo posebne priprave vzorcev. Trdni vzorci v svoji začetni obliki (prášek, granulati, tablete ipd.) se lahko uporabijo celo v originalni embalaži, če le-ta ni v celoti kovinska. Pri kombinaciji plastične embalaže prekrte s kovinskim pretisnim ovojem (blister pakiranje) kovinska prevleka ne sme biti



Slika 4: JKR ^{14}N spektri dušika N(2) (najvišja frekvenca (ν^+ črta) za začetni vzorec polimorfa α (s primesjo β). Vzorec sulfanilamida smo gredli pri različnih temperaturah, ki so označene na levi strani krivulj, ki predstavljajo rezultate JKR meritev. Pred meritvijo smo vzorec najprej ohladili nazaj na sobno temperaturo 295 K.

debelejša od vdorne globine za EM valovanja. Pri tem je pomembna pravilna orientacija embalaže v RF tuljavi [18]. Ko enkrat poznamo vse JKR ^{14}N frekvence prehodov za vse polimorfne oblike v sulfanilamidu, lahko izberemo le eno od teh (ponavadi tisto, ki nam da najboljše razmerje S/N), s katero identificiramo ali potrdimo prisotnost določenega polimorfa. Metoda je tudi dovolj hitra, tako čas potreben za testiranje ni kritičen. Da dobimo dovolj velik JKR ^{14}N signal v sulfanilamidu potrebujemo le nekaj minut. Primer takega testa je prikazan na sliki Fig. 3. Če imamo JKR ^{14}N spektrometer kalibriran, lahko kvantitativno določimo tudi delež posameznih polimorfov v mešanici z več polimornimi oblikami.

JMR in JKR RF spektroskopski metodi sta obe uspešni pri zaznavi polimorfizma v sulfanilamidu. Vendar bi JKR spektroskopijo zaradi njene enostavnosti in zanesljivosti pri določitvi vsebnosti posameznih polimorfov, lahko uporabili kot sekundarno standardno metodo za zaznavo in potrditev pojavnosti polimorfizma v trdnih farmacevtskih izdelkih, ki vsebujejo dušik. To velja tako za čiste AFS kot tudi za končne farmacevtske izdelke.

V tej raziskavi smo pokazali učinkovito uporabo JKR ^{14}N pri hitrem, nedestruktivnem in zanesljivem ugotavljanju pojave polimorfizma v trdnih farmacevtskih vzorcih, ki vsebujejo dušik. Poleg RSA, ki predstavlja primarno metodo, bi JKR spektroskopska metoda lahko igrala vlogo hitrega sekundarnega etalona za določanje polimorfizma.

Literatura

- [1] J. Bernstein, *Polymorphism in Molecular Crystals*, Oxford University Press, Oxford, 2002
- [2] S. Chemburkar, J. Bauer, K. Deming, H. Spiwek, K. Patel, J. Morris, R. Henry, S. Spanton, W. Dziki, W. Porter, J. Quick, P. Bauer, J. Donaubauer, B. Narayanan, M. Soldani, D. Riley, K. McFarland, Dealing with the Impact of Ritonavir Polymorphs on the Late Stages of Bulk Drug Process Development, *Org. Process Res. Dev.* 4 (5) (2000) 413–417, doi:10.1021/op000023y
- [3] 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 (6) (2015) 1909–1919, doi:10.1002/jps.24421
- [4] J. Lužnik, 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 (9) (2014) 2704–2709, doi:10.1002/jps.23956
- [5] 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 (12) (2010) 4857–4865, doi:10.1002/jps.22186
- [6] J. Pirnat, J. Lužnik, V. Jazbinšek, V. Žagar, J. Seliger, T. Klapoetke, Z. Trontelj, ^{14}N NQR in the tetrazole family, *Chem. Phys.* 364 (1-3) (2009) 98–104, doi:10.1016/j.chemphys.2009.09.011
- [7] B. O'Connor, E. Maslen, The crystal structure of α -sulphanilamide, *Acta Crystallogr.* 18 (3) (1965) 363–366, doi:10.1107/S0365110X65000828
- [8] M. Alléaume, J. Decap, Affinement tridimensionnel du sulfanilamide β , *Acta Crystallogr.* 18 (4) (1965) 731–736, doi:10.1107/S0365110X65001676
- [9] M. Alléaume, J. Decap, Affinement tridimensionnel du sulfanilamide χ , *Acta Crystallogr.* 19 (4) (1965) 934–938, doi:10.1107/S0365110X6500467X
- [10] A. O'Connell, E. Maslen, X-ray and neutron diffraction studies of β -sulphanilamide, *Acta Crystallogr.* 22 (1) (1967) 134–145, doi:10.1107/S0365110X67000210
- [11] A. Portieri, R. Harris, R. Fletton, R. Lancaster, T. Threlfall, Effects of polymorphic differences for sulfanilamide, as seen through ^{13}C and ^{15}N solid-state NMR, together with shielding calculations, *Magn. Reson. Chem.* 42 (3) (2004) 313–320, doi:10.1002/mrc.1351
- [12] R. Blinc, J. Seliger, A. Zidanšek, V. Žagar, F. Miličič, H. Robert, ^{14}N nuclear quadrupole resonance of some sulfa drugs, *Solid State NMR* 30 (2) (2006) 61–68, doi:10.1016/j.ssnmr.2006.02.003
- [13] T. Das, E. Hahn, *Nuclear Quadrupole Resonance Spectroscopy*, Academic Press, New York, 1958
- [14] A. Abragam, *The Principles of Nuclear Magnetism*, Clarendon, Oxford, 1961
- [15] S. Toscani, S. Thorén, V. Agafonov, R. Céolin, J. Dugué, Thermodynamic Study of Sulfanilamide Polymorphism: (I) Monotropy of the α -Variety, *Pharm. Res.* 12 (10) (1995) 1453–1456, doi:10.1023/A:1016271017802
- [16] S. Toscani, A. Dzyabchenko, V. Agafonov, J. Dugué, R. Céolin, Polymorphism of Sulfanilamide: (II) Stability Hierarchy of α -, β - and γ - Forms from Energy Calculations by the Atom-Atom Potential Method and from the Construction of the p, T Phase Diagram, *Pharm. Res.* 13 (1) (1996) 151–154, doi:10.1023/A:1016058123659
- [17] R. A. Marino, S. M. Klainer, Multiple spin echoes in pure quadrupole resonance, *J. Chem. Phys.* 67 (13) (1977) 3388–3389, doi:10.1063/1.435286
- [18] J. Barras, K. Althoefer, M. Rowe, I. Poplett, J. Smith, The Emerging Field of Medicines Authentication by Nuclear Quadrupole Resonance Spectroscopy, *Appl. Mag. Res.* 43 (4) (2012) 511–529, doi:10.1007/s00723-012-0320-2