

UNIVERZA V LJUBLJANI  
FAKULTETA ZA FARMACIJO

**ZORAN LAVRIČ**

**DIPLOMSKA NALOGA**

**UNIVERZITETNI ŠTUDIJ FARMACIJE**

Ljubljana, 2009

UNIVERZA V LJUBLJANI  
FAKULTETA ZA FARMACIJO

ZORAN LAVRIČ

**UPORABA JEDRSKE KVADRUPOLNE RESONANCE ZA KVALITATIVNO IN  
KVANTITATIVNO PROUČEVANJE POLIMORFIZMA NIFEDIPINA IN  
PIROKSIKAMA**

**UTILIZATION OF NUCLEAR QUADRUPOLE RESONANCE FOR  
QUALITATIVE AND QUANTITATIVE STUDY OF NIFEDIPINE AND  
PIROXICAM POLYMORPHISM**

**DIPLOMSKA NALOGA**

Ljubljana, 2009

Diplomsko naložko sem opravljal na Katedri za farmacevtsko tehnologijo Fakultete za farmacijo ter Oddelku za fiziko Inštituta za matematiko, fiziko in mehaniko v Ljubljani pod mentorstvom prof. dr. Staneta Srčiča, mag. farm., ter somentorstvom prof. dr. Zvonka Trontlja. Meritve dvojne resonance so bile opravljene na Inštitutu Jožef Stefan.

Mentorju, prof. dr. Stanetu Srčiču, ter somentorju, prof. dr. Zvonku Trontlju, se iskreno zahvaljujem za veliko potrpljenja, strokovno vodenje ter pomoč, ki sta ga pokazala pri izdelavi diplomske naloge.

Najlepše se zahvaljujem vsem sodelavcem Katedre za farmacevtsko tehnologijo FFA in Oddelka za fiziko IMFM, še posebno pa dr. Janezu Pirnatu ter dr. Janku Lužniku, s katerimi smo skupaj preživeli mnoge prijetne delovne dni, pri tem pa sta mi s svojim znanjem ter nasveti izredno pomagala pri spoznavanju z (zame) novo spektroskopsko metodo. Zahvalil bi se še dr. Seligerju ter ing. Žagarju z Inštituta Jožef Stefan za opravljene meritve z dvojno resonanco.

Nenazadnje pa se zahvaljujem staršema za vso podporo v času mojega študija.

#### Izjava

**Izjavljam, da sem diplomsko delo samostojno izdelal pod mentorstvom prof. dr. Staneta Srčiča, mag. farm., ter somentorstvom prof. dr. Zvonka Trontlja.**

**Zoran Lavrič**

Ljubljana, april 2009

Predsednik diplomske komisije: zas. prof. dr. Aleš Krbavčič

Član diplomske komisije: izr. prof. dr. Vojko Kmetec

# KAZALO

<b>KAZALO .....</b>	<b>1</b>
<b>1    POVZETEK .....</b>	<b>4</b>
<b>2    SEZNAM OKRAJŠAV .....</b>	<b>5</b>
<b>3    UVOD .....</b>	<b>6</b>
<b>    3.1    Jedrski kvadrupolni moment .....</b>	<b>6</b>
3.1.1    Jedrska kvadrupolna resonanca (JKR) .....	7
3.1.1.1    Osno simetrični električni gradient .....	8
3.1.1.2    Osno nesimetrični gradijeni .....	9
Polštevilčne vrednosti jedrske vrtilne količine j .....	9
Celoštevilčne vrednosti jedrske vrtilne količine j .....	10
$^{14}\text{N}$ .....	10
<b>    3.2    Merjenje odziva jedrskih kvadrupolnih resonanc .....</b>	<b>11</b>
<b>    3.3    Trdna snov .....</b>	<b>17</b>
3.3.1    Kristali .....	17
3.3.2    Polimorfi .....	17
3.3.3    Amorfna snov .....	21
3.3.4    Vpliv strukture trdne snovi na električni gradient v okolici jedra .....	22
<b>    3.4    Jedrska kvadrupolna resonanca v farmaciji .....</b>	<b>23</b>
<b>4    NAMEN DELA .....</b>	<b>26</b>
<b>5    MATERIALI IN METODE .....</b>	<b>27</b>
<b>    5.1    Materiali .....</b>	<b>27</b>
5.1.1    Uporabljene zdravilne učinkovine .....	27
5.1.1.1    Sulfanilamid .....	28
5.1.1.2    Piroksikam .....	29
5.1.1.3    Nifedipin .....	30
5.1.2    Ostale uporabljene snovi .....	31

5.1.3	Aparature in materiali .....	31
<b>5.2</b>	<b>Metode .....</b>	<b>36</b>
5.2.1	Priprava različnih oblik zdravilnih učinkovin .....	36
5.2.1.1	Priprava sulfanilamida alfa .....	36
5.2.1.2	Priprava sulfanilamida beta .....	36
5.2.1.3	Priprava sulfanilamida gama .....	36
5.2.1.4	Priprava piroksikama I ( $\beta$ oz. kubična oblika) .....	36
5.2.1.5	Priprava piroksikama II ( $\alpha$ oz. iglična oblika) .....	36
5.2.1.6	Priprava steklaste oblike nifedipina .....	37
5.2.2	Priprava vzorcev za merjenje $^{14}\text{N}$ JKR odzivov .....	37
5.2.2.1	Polnitve vzorcev .....	38
	Sulfanilamid .....	38
	Piroksikam .....	39
	Nifedipin .....	40
5.2.3	Meritve vzorcev .....	41
5.2.3.1	DSC .....	41
5.2.3.2	FT-IR .....	41
5.2.3.3	$^{14}\text{N}$ JKR .....	42
	Koncentracijska odvisnost piroksikam signalov pri obeh $\nu + ^{14}\text{N}$ JKR, t.j. 2587 ter 3439kHz .....	43
	Opazovanje prehoda steklastega nifedipina v obliko I pri $\nu + ^{14}\text{N}$ JKR 2587kHz .....	43
	Obdelava podatkov NQR sistem 1 .....	45
	Segmentacija .....	46
	Obdelava podatkov NQR sistem 2 .....	47
	Blackmanovo okno .....	48
	Linearna regresija .....	48
	Boltzmannova sigmoidna krivulja .....	48
<b>6</b>	<b>REZULTATI IN RAZPRAVA .....</b>	<b>49</b>
<b>6.1</b>	<b>Sulfanilamid .....</b>	<b>49</b>
6.1.1	DSC .....	49
6.1.2	IR .....	50
6.1.3	$^{14}\text{N}$ JKR .....	52
6.1.3.1	Iskanje $^{14}\text{N}$ kvadrupolnih resonanc sulfanilamida prekristaliziranega iz n-butanola .....	52
6.1.3.2	Sulfanilamid beta pri 3072kHz .....	53
6.1.3.3	Sulfanilamid beta pri 3424kHz .....	56
<b>6.2</b>	<b>Piroksikam .....</b>	<b>59</b>
6.2.1	DSC .....	59

6.2.2	IR.....	60
6.2.3	<sup>14</sup> N JKR .....	62
6.2.3.1	Koncentracijska odvisnost pri 2587kHz .....	66
6.2.3.2	Koncentracijska odvisnost pri 3439kHz .....	67
6.2.3.3	Prekristalizirani oblici I in II piroksikama .....	68
<b>6.3</b>	<b>Nifedipin .....</b>	<b>70</b>
6.3.1	DSC .....	70
6.3.2	IR.....	71
6.3.3	<sup>14</sup> N JKR .....	72
6.3.3.1	Nifedipin I pri 2590kHz.....	72
6.3.3.2	Amorfno stanje nifedipina .....	75
6.3.3.3	Prehajanje amornega nifedipina v obliko I pri 65C .....	77
6.3.3.4	Prehajanje amornega nifedipina v obliko I pri 70C .....	79
6.3.3.5	Prehajanje amornega nifedipina v obliko I pri 75C .....	80
6.3.3.6	Prehajanje amornega nifedipina v obliko I pri 80C.....	81
6.3.3.7	Temperaturna odvisnost hitrosti nastajanja nifedipina I .....	82
6.3.3.8	Ireverzibilnost prehajanja steklastega nifedipina v stabilno obliko I .....	85
6.3.3.9	Prikaz odvisnosti t <sub>10</sub> od temperature kristalizacije .....	86
<b>7</b>	<b>SKLEP .....</b>	<b>88</b>
<b>8</b>	<b>LITERATURA .....</b>	<b>89</b>

# 1 POVZETEK

V sklopu diplomske naloge smo preverili sposobnost  $^{14}\text{N}$  jedrske kvadrupolne resonance (JKR), da razlikuje med različnimi oblikami sulfanilamida, piroksikama ter nifedipina. Kot referenčne metode smo uporabili DSC ter FT-IR.

Dobavljeni tržno dostopni obliki sulfanilamida je bila v najstabilnejši beta obliki. Dodatno smo s prekristalizacijo iz n-butanola ter 96% etanola pripravili še dve obliki. Beta oblika ima znane resonančne frekvence pri 3072 ter 3424kHz. Pri teh dveh frekvencah smo pomerili tudi oba pripravljena vzorca. Oba sta se glede na JKR rezultate bistveno razlikovala od beta oblike. To so potrdili tudi DSC termogrami ter FT-IR spektri.

Pri piroksikamu smo z JKR proučevali dobavljeni monohidrat ter obliko I. Pri tem smo pri obliki I našli resonančni frekvenci pri 2587 ter 3439kHz. Pri teh dveh frekvencah monohidrat ni dajal signala. Dodatno smo s prekristalizacijo pripravili obliki I in II, ki smo ju nato opazovali pri 2587kHz. Pri prekristalizirani obliki I smo zaznali signal, medtem ko ga pri II ni bilo. Ti rezultati so potrdili istovetnost dobavljenega piroksikama in pripravljene oblike I. Ker je bil signal pri 2587kHz dokaj močan, smo pripravili še mešanice oblike I v monohidratu pri različnih koncentracijah. Pomerili smo JKR odziv pri obeh frekvencah, podatke vnesli na graf odvisnosti odziva od koncentracije ter izračunali parametre linearne regresije. Vrednost  $R^2$  je bila pri tem zelo ugodna.

Pri dobavljenem nifedipinu, ki se je nahajal v najstabilnejši obliki I, smo našli resonančni frekvenci pri 2170 ter 2590kHz. Nato smo pripravili steklasto obliko nifedipina, ki smo jo opazovali pri 2590kHz, kjer pa ni imela odziva. Zato smo se odločili, da poskusimo opazovati dinamiko prehajanja steklastega nifedipina v obliko I. Steklasti nifedipin smo greli nekaj časa pri povišani temperaturi, nato hitro ohladili, ter pomerili odziv. To smo storili za več temperatur. Prikaz podatkov na grafu je prikazal lepo sigmoidno obliko, kateri smo prilegali Boltzmannovo sigmoidno krivuljo. Pri tem smo opazili še zanimivo lastnost merjenj odzivov nastajajoče oblike I. Namreč višina končnega dela eksponentne rasti (plato sigmoidne krivulje) je bila odvisna od temperature.

Metoda  $^{14}\text{N}$  JKR je sposobna razlikovati med posameznimi polimorfnimi oblikami. Ob primerno močnem signalu je primerna tudi za morebitna kvantitativna opazovanja. Dodatno smo prikazali tudi novo možnost uporabe JKR za proučevanje dinamičnih procesov kristalizacije iz amorfnegata stanja.

## 2 SEZNAM OKRAJŠAV

**JKR** - jedrska kvadrupolna resonanca

**NMR** - nuklearna magnetna resonanca

**FID** – »free induction decay« (razpad proste precesije jeder)

**T<sub>1</sub>** - časovna konstanta, ki opisuje spin-mrežno relaksacijo

**T<sub>2</sub>** - časovna konstanta, ki opisuje spin-spinsko relaksacijo (dekoherenca)

**CPMG** – Carr-Purcell-Meiboom-Gill pulzna sekvenca

**RF** - radijske frekvence oz. radiofrekvenčen

**FO** - farmacevtska oblika

**IMFM** - Inštitut za matematiko, fiziko in mehaniko

**FFT** - hitra Fourierjeva transformacija

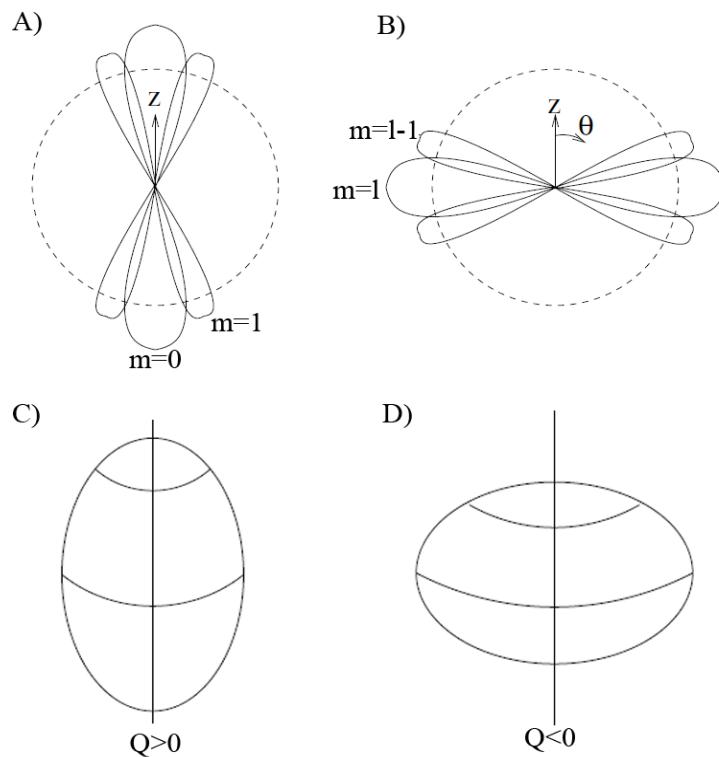
**FT-IR** – infrardeča spektroskopija

**DSC** – diferenčna dinamična kalorimetrija

### 3 UVOD

#### 3.1 JEDRSKI KVADRUPOLNI MOMENT

Jedrski kvadrupolni moment izvira iz sferično nesimetrične porazdelitve naboja v jedru. Ta pa sledi iz njegove zgradbe. Obstaja več načinov modeliranja atomskega jedra (model kapljice, Fermijev plin, model lupin...) (1,2). Pri modelu lupin lahko ravno tako kot elektronsko ovojnico, tudi atomsko jedro opišemo s pomočjo valovnih funkcij in pripadajočih kvantnih števil. Po tej razlagi je deformacija jedra posledica polnjenja jedrskeh orbital. Jedrska močna sila deluje na kratke razdalje. Čim bolj se prekrivajo orbitale nukleonov, tem večja je vezna energija jedra. Posledično bodo za polnjenje bolj ugodne orbitale, ki imajo določeno prekrivanje (slika 1).



Slika 1. V primeru nepolnih jedrskih lupin se orbitale prednostno polnijo, kar povzroči jedrsko deformacijo. Če pari nukleonov najprej polnijo orbitale z magnetnim številom okoli nič (A), je jedro vzdolžno deformirano s pozitivnim kvadrupolnim momentom (C). V primeru, da se najprej polnijo orbitale z visokim magnetnim številom (B), pa je jedro diskaste oblike (D), z negativnim kvadrupolnim momentom. Z os ponazarja os simetrije kvadrupolnih jader.

Električni kvadrupolni moment jedra stopa v interakcijo z gradientom električnega polja, oz. krajše električnim gradientom, v njegovi okolici. To izrazimo s Hamiltonovim operatorjem (enačba 1):

$$\mathcal{H}_q = \sum_{m=-2}^2 e \mathcal{K}^m \mathcal{V}_2^m \quad /1/$$

kjer je  $\mathcal{K}$  kvadrupolni operator jedra,  $e$  negativni električni naboj v okolici,  $\mathcal{V}$  pa operator električnega gradienca na jedru (3). Tako dobimo zapis za interakcijo jedrskega kvadrupolnega momenta z električnim gradienptom, ki ga ustvarja elektronska ovojnica na položaju jedra.

Kot vemo, igra elektronska ovojnica glavno vlogo pri povezovanju atomov in je izredno dojemljiva na vplive iz okolice. Bližnji atomi, ter atomi znotraj molekule vplivajo na stanje elektronske ovojnice in posledično na električni gradien, ki ga čuti opazovano atomske jedro. To se kaže v različnih energetskih stanjih kvadrupolne sklopite. Posledično lahko te razlike zaznavamo z merjenjem jedrske kvadrupolne resonance, ki temelji na vzbujanju prehodov med temi energijskimi nivoji.

### **3.1.1 JEDRSKA KVADRUPOLNA RESONANCA (JKR)**

Pri jedrski kvadrupolni resonanci opazujemo direktne prehode med kvadrupolnimi energijskimi nivoji, kot jih predstavljajo rešitve kvadrupolnega Hamiltoniana (enačba 1). Prehode med temi nivoji je mogoče opazovati le v trdni snovi. V tem primeru so električni gradieni fiksni v prostoru in jih trkanje ter vibriranje molekul ne izniči. Npr. v tekočinah je zaradi nenehnega trkanja in vrtenja molekul življenska doba električnega gradienca, ki izhaja iz trenutne razporeditve zelo majhna. Prav tako se z gradienptom spreminjajo energijski nivoji. Posledica je velika razcepljenost ter kratkoživost energijskih nivojev. Spektralni vrhovi se posledično tako zelo razširijo, da se ne razlikujejo več od ozadja.

Jedrsko kvadrupolno resonanco opazimo torej le v trdni snovi. Električni gradien se v tem primeru znatno ne spreminja, ter je fiksen v prostoru.

V ustreznem izbranem koordinatnem sistemu (t. i. lastnem sistemu) lahko tenzor električnega polja zapišemo z le dvema členoma (enačbi 2 in 3).

$$V^{\pm 2} = \frac{1}{2\sqrt{6}}(V_{xx} - V_{yy} \pm 2iV_{xy}) = \frac{V_{xx} - V_{yy}}{2\sqrt{6}} \quad /2/$$

$$V^0 = \frac{1}{2}V_{zz} \quad /3/$$

$V$  označuje tenzor gradiента električnega polja. Pišemo še  $eq = V_{zz}$  in  $\eta = \frac{V_{xx} - V_{yy}}{V_{zz}}$ . Prvi parameter predstavlja največjo vrednost gradienta, ki zaradi takšne izbire koordinatnega sistema leži v smeri osi  $z$ . Drugi pa je parameter asimetrije tenzorja električnega polja (3,4).

Rešitve Hamiltonovega operatorja (enačba 1) so vrednosti energijskih stanj kvadrupolne interakcije jedra z gradientom električnega polja. Uporabno informacijo o snovi nam poda ravno prehajanje kvadrupolnih momentov med temi energetskimi stanji. Te prehode dosežemo z radijskimi frekvencami (RF) od nekaj sto kHz (npr.  $^{14}N$ ) do več 100MHz (npr.  $^{81}Br$ ,  $^{127}I$ ) (3,5).

### 3.1.1.1 OSNO SIMETRIČNI ELEKTRIČNI GRADIENT

V primeru osno simetričnega gradienta je  $\eta = 0$ . Energija takšnega sistema je podana z (enačba 4):

$$E_m = A(3m^2 - j(j+1)), \quad A = \frac{e^2 q K}{4j(2j-1)} \quad /4/$$

$j$  je jedrski spin.  $m$  pri tem obsega vrednosti  $(-j, -1 + 1, \dots, j - 1, j)$ .  $e$  je celokupni naboj jedra (vsota nabojev protonov).  $K$  predstavlja vsoto geometrijskih komponent sistema nukleonov jedra, ki opisujejo njegov kvadrupolni moment. Produkt  $eK$  je električni kvadrupolni moment jedra,  $eq$  pa predstavlja vrednost največje komponente tenzorja električnega gradienta v lastnem sistemu ( $eq = V_{zz}$ ). Na členu  $m^2$  se vidi, da so energetska stanja osno simetričnega gradienta degenerirana. Enako vrednost dobimo za  $m$  in  $-m$ . Položaja kvadrupolnega momenta pri  $m$  in  $-m$  sta namreč simetrična glede na ravnino v kateri je  $z$  os.

Frekvenca povezana s prehodi med dvema energijskima nivojema ( $|m| \Rightarrow |m + 1|$ ) je enaka (enačba 5):

$$\nu = \frac{3|A|}{h} (2|m| + 1), \quad /5/$$

pri čemer smo upoštevali, da je frekvenca odvisna od razlike med energetskima stanjem  $\nu = \frac{\Delta E}{h}$ . Za celoštevilčno vrtilno količino  $j$  je število prehodov enako kar njej sami. V primeru polštevilčnih, pa je enako  $(j - \frac{1}{2})$ . V tem primeru lahko z merjenjem resonance določimo jakost sklopitvene konstante  $A$ .

### 3.1.1.2 OSNO NESIMETRIČNI GRADIENTI

V tem primeru je  $\eta \neq 0$  in tenzor nima osne simetrije glede na  $z$ .

#### **Polštevilčne vrednosti jedrske vrtilne količine $j$**

Eksaktne rešitve za energijske nivoje sklopitve so v tem primeru možne le za  $j = \frac{3}{2}$  (enačba 6).

$$E_{|\frac{3}{2}|} = 3A(1 + \frac{\eta^2}{2})^2; \quad E_{|\frac{1}{2}|} = -3A(1 - \frac{\eta^2}{3})^2 \quad /6/$$

Za večje vrednosti jedrskega spina moramo rešiti enačbe numerično za različne vrednosti  $\eta$ . Pri tem pa degeneriranost nivojev ni odstranjena z asimetrijo gradienca. Tako lahko pri spinih  $j = \frac{3}{2}$  še vedno opazimo le en prehod (enačba 7).

$$\nu_{-\frac{3}{2} \rightarrow -\frac{1}{2}} = \nu_{\frac{3}{2} \rightarrow \frac{1}{2}} = \frac{e^2 q K}{2h} (1 + \frac{\eta^2}{3})^{\frac{1}{2}} \quad /7/$$

Tako v tem primeru ne moremo določiti sklopitvene konstante  $A$  kot tudi ne faktorja asimetrije  $\eta$ . Lahko pa ju določimo pri vrednostih spina  $j \geq \frac{5}{2}$ .

### Celoštevilčne vrednosti jedrske vrtilne količine $j$

Celoštevilčni jedrski spini so redki za stabilne izotope. Edini elementi, katerih odstotek izotopov s celim spinom v naravi je večji, se nahajajo med luhkimi jedri ( ${}^6Li$  ( $j = 1$ )),  ${}^{10}B$  ( $j = 3$ ),  ${}^{14}N$  ( $j = 1$ ). Med temi je v naravi najpogosteji dušik  ${}^{14}N$  (99,635%), ki je tako med celoštevilčnimi jedri najprimernejši za opazovanje.

Pri  $j = 1$  ( ${}^{14}N$ ) faktor asimetrije ne vpliva na stanje  $m = 0$ , medtem ko se energijska nivoja  $m = \pm 1$  razlikujeta zaradi vpliva  $\eta$  (enačba 8).

$$E_{-1} = A(1 - \eta), \quad E_0 = -2A, \quad E_1 = A(1 + \eta) \quad /8/$$

To pa povzroči nastanek treh črt v spektru z resonančnimi frekvencami (enačbe 9-11):

$$\nu_+ = \nu_{0 \rightarrow 1} = \frac{3e^2 qK}{4h} \left( 1 + \frac{\eta}{3} \right) \quad /9/$$

$$\nu_- = \nu_{0 \rightarrow -1} = \frac{3e^2 qK}{4h} \left( 1 - \frac{\eta}{3} \right) \quad /10/$$

$$\nu_0 = \nu_{-1 \rightarrow 1} = \frac{\eta e^2 qK}{2} \quad /11/$$

Velikost  $\nu_0$  je direktno povezana s faktorjem asimetrije električnega gradienta in je enaka razliki med višjo ter nižjo frekvenco ( $\nu_+ - \nu_-$ ).

### ${}^{14}N$

dušik ima kvadropolne resonančne frekvence v območju 0,1-5MHz. Nizka frekvenca sklopitev pomeni majhno energijo sklapljanja z električnim gradientom na položaju jedra. Glede na Boltzmannovo distribucijo zasedenosti energijskih nivojev to pomeni majhno razliko v številu jeder med zgornjim in spodnjim energijskim nivojem (6). Posledično se zmanjša tako intenziteta signala kot tudi spektralna resolucija.

## 3.2 MERJENJE ODZIVA JEDRSKIH KVADRUPOLNIH RESONANC

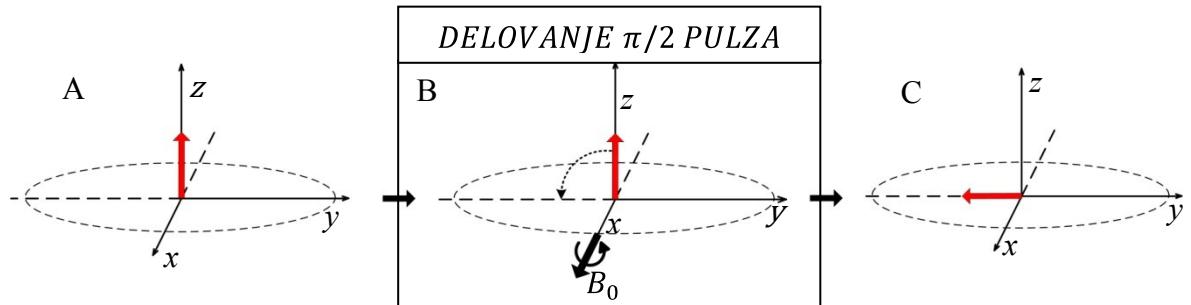
Opazovanje jedrske kvadrupolne resonance (JKR) temelji na podobnih osnovah kot opazovanje sklopitve jader pri nuklearni magnetni resonanci (NMR). Sklopitev pri JKR, in posledična razlika v energijskih nivojih, izvira iz električnih polj in nabojev znotraj snovi. Pri NMR pa iz sklapljanja magnetnih momentov jader in zunanjega magnetnega polja (7). Vendar pa obe metodi uporablja magnetne momente jader za absorpcijo energije preko radiofrekvenčnega valovanja. To povzroči prehode med različnimi energijskimi nivoji jader, ki jih lahko preko magnetne indukcije tudi zaznamo.

Podobno kot precesirajoča jedra pri NMR, lahko obravnavamo tudi precesijo kvadrupolnih jader pri JKR. Zato je tudi načrtovanje pulznih sekvenc enako in temelji na enakih osnovah kot pri opazovanju NMR.

V trdni snovi je električni gradient na položaju jedra pri določeni temperaturi in tlaku relativno fiksen. Razmerja med populacijami jader v posameznem kvadrupolnem energijskem nivoju opisuje Boltzmannova distribucija. Jedra v danem nivoju precesirajo okoli  $z$  osi električnega gradiента ( $V_{zz}$ ). V monokristalu je smer največjega električnega gradienta ( $V_{zz}$ ) enaka pri vsakem simetrijsko enakoležnem kvadrupolnem jedru v celi volumnu. V tem primeru je JKR še najbolj podobna NMR, le namesto enakomernega magnetnega polja imamo enako usmerjen električni gradient. Signal je boljši, če je kristal v tuljavi pravilno obrnjen. Smer  $V_{zz}$  mora biti prečna na os tuljave.

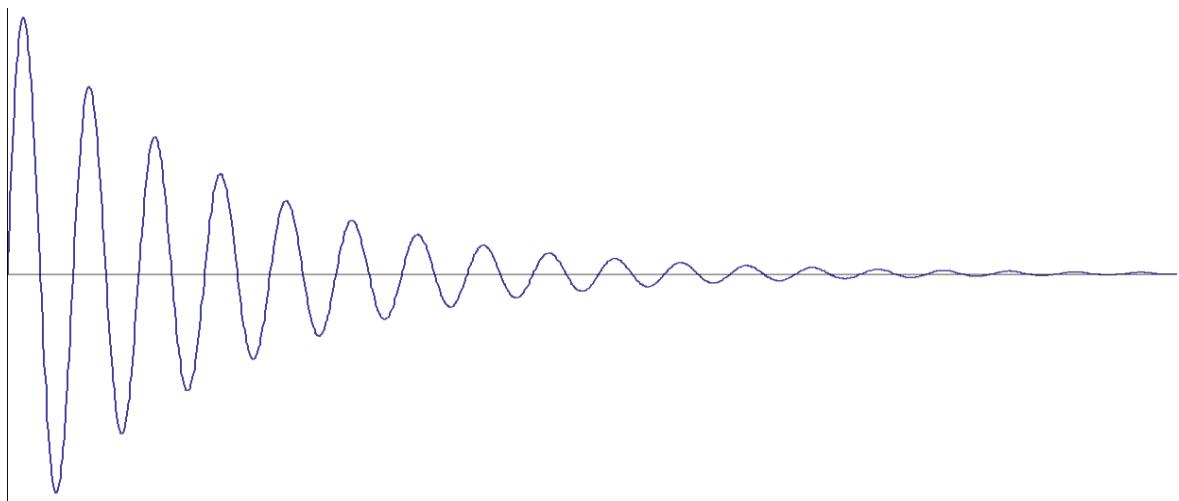
Vendar je opazovanje JKR monokristalov praktično težko izvedljivo, tako da se največ uporablja JKR polikristaliničnih (uprašenih) trdnih snovi. Pri opazovanju teh snovi je potrebno upoštevati naključno usmerjenost trdnih delcev. To pomeni, da pri opazovanju praškov prispeva k signalu največ tisti delež resonančnih jader, pri katerih je smer največjega električnega gradienta ( $V_{zz}$ ) prečna na tuljavo.

Absorpcijo energije in prehod magnetnih momentov jader dosežemo, ko ti reagirajo z magnetno komponento RF valovanja. Jedra absorbirajo energijo le, ko je frekvenca RF valovanja ( $\nu_0 = E/h$ ) enaka resonančni frekvenci kvadrupolne sklopite (enčbe 5, 7, 9, 10, 11). V tem primeru magnetna komponenta RF valovanja v rotirajočem koordinatnem sistemu (dalje koordinatni sistem) povzroči rotacijo magnetizacije okoli svoje osi v ravni xy (slika 2). Pravilni obrat se zgodi v določenem času, ki ga označimo s  $t_{\pi/2}$  ( $t_{\frac{\pi}{2}} = \frac{\varphi}{\omega} = \frac{\pi}{2\pi} = \frac{1}{4\nu}$ ). Pulz, ki ima frekvenco  $\nu_0$  in traja  $t_{\pi/2}$  imenujemo  $\pi/2$  pulz.



Slika 2. Shema, ki prikazuje prestavitev magnetizacije v rotirajočem koordinatnem sistemu za  $90^\circ$  na xy ravnino s pomočjo delovanja  $\pi/2$  pulza.

Tako po  $\pi/2$  pulzu je magnetizacija jader v koordinatnem sistemu koherentna, kar pomeni, da večina jader precesira z enako fazo. Na tej točki bi sedaj z opazovanjem in merjenjem odziva videli eksponetno upadanje signala oz. t.i. 'free induction decay' (FID; razpad proste precesije jader) (slika 3).



Slika 3. FID odziva po  $\pi/2$  pulzu.

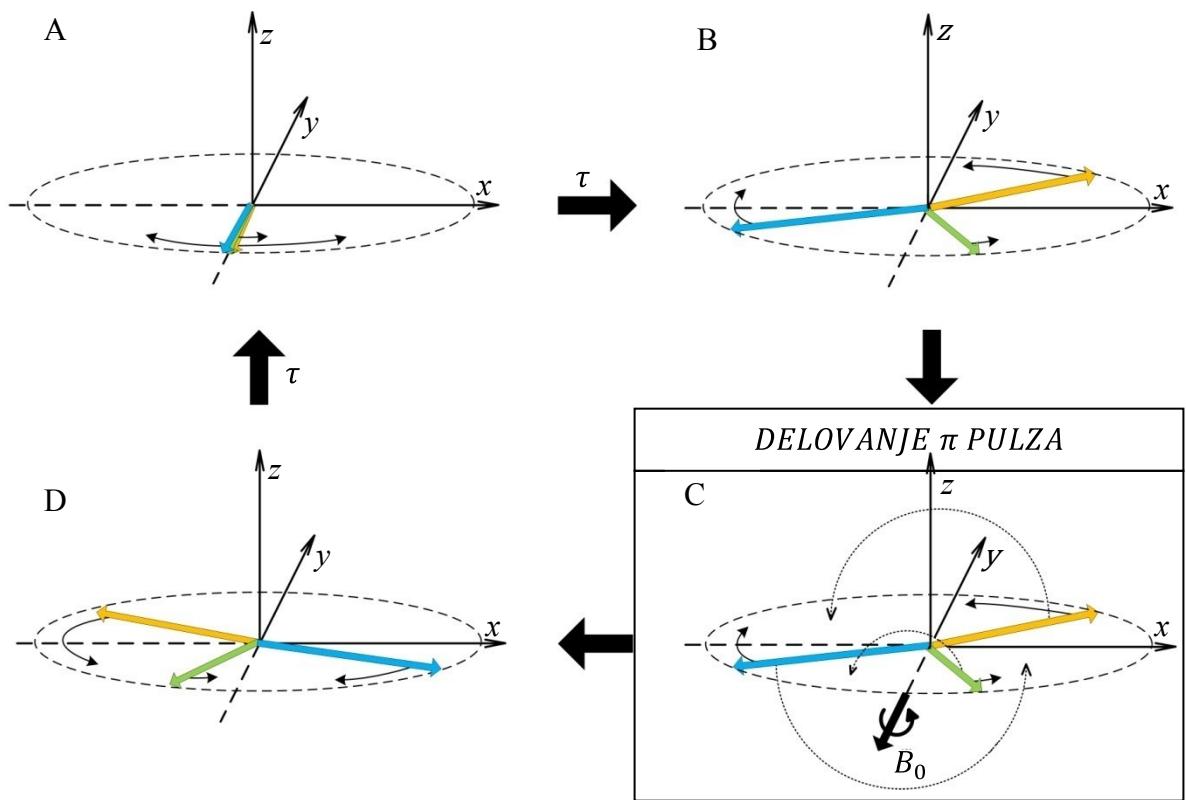
Eksponentno upadanje signala pri FID je sestavljen iz dveh prispevkov: »spin-spinske« relaksacije ( $T_2$ ), ter neznatnega prispevka »spin-mrežne« relaksacije ( $T_1$ ).

Spin-mrežna relaksacija označuje nepovratno prehajanje jedrskih spinov z višjega v nižji energijski nivo preko interkacije jeder z okolico. Lahko rečemo vračanje v termično ravnovesno zasedbo nivojev.

Medtem pa spin-spinska relaksacija ne označuje interakcij med spini, kot bi lahko sklepali iz poimenovanja, temveč je oznaka za proces, ki pripelje do dekoherenca precesirajočih jeder. Signala zaradi tega ne moremo opaziti kljub temu, da je sistem še vedno v vzbujenem stanju (7). Spin-spinska relaksacija je sestavljena iz dveh prispevkov, ki pomembno vplivata na lastnosti merjenega resonančnega odziva.

Prvi je posledica naključnih nihanj električnih gradientov okoli opazovanih kvadrupolnih jeder. To povzroči trenutne spremene resonančnih frekvenc, ki vodijo do nepovratne izgube koherence .

Drugi prispevek pa nastane zaradi različnih defektov in razlik znotraj trdne snovi, ki pripeljejo do porazdelitve električnih gradientov okoli neke srednje vrednosti. Posledično so okoli neke srednje vrednosti porazdeljeni tudi energijski nivoji ter resonančne frekvence. V tem primeru so energijski nivoji odvisni od položaja jeder v snovi. Vpliv tega prispevka na spin-spinsko relaksacijo posamezne komponente magnetizacije je časovno nespremenljiv. Zato lahko za ponovno dosego koherence uporabimo Carr-Purcell-Meiboom-Gill (CPMG) pulzno sekvenco (7,8). Njen potek je prikazan na sledečem diagramu (slika 4).



Slika 4. Učinek  $\pi$  pulza na komponente magnetizacije pri Carr-Purcell-Meiboom-Gill pulzni sekvenci. V rotirajočem koordinatnem sistemu prikazana dekoherenca magnetizacije se po učinku  $\pi$  pulza ponovno za trenutek vrne v koherenco (pojav t. i. odmeva).

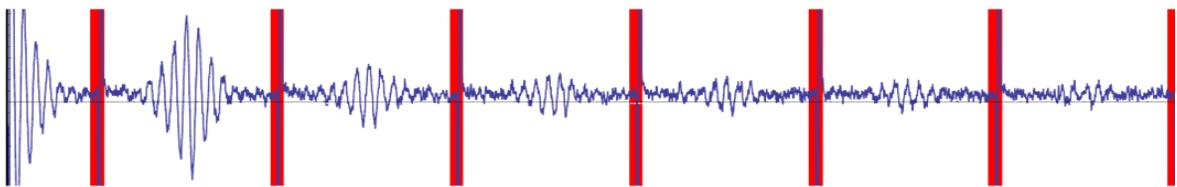
Po  $\pi/2$  pulzu povzroči spin-spinska relaksacija v določenem času ( $\tau$ ) dekoherenco celokupne magnetizacije (Slika 8, B).

Za povrnitev signala si lahko pomagamo z novim pulzom pri  $v_0$ . Vendar pa je v tem primeru valovanje zamaknjeno za fazo  $90^\circ$  glede na začetni pulz (primerjava slik 2.B in 4.C). Trajanje novega pulza je ravno dvakrat daljše od začetnega vzbujevalnega. To v koordinatnem sistemu povzroči rotacijo posameznih komponent celokupne magnetizacije za  $180^\circ$  okrog osi  $B_0$  (slika 8, C). Zgodi se preslikava vektorjev magnetizacije v ravnini xy preko osi  $B_0$ . Pri tem pa se smer hitrosti dekoherence magnetizacije ohrani. To pomeni, da se bodo komponente magnetizacije sedaj vračale v koherenco z enako hitrostjo, kot so prej postajale razpršene. Pulz, ki doseže takšen spinski obrat imenujemo  $\pi$  pulz, njegovo trajanje pa označimo s  $t_\pi$ .

Po časovnem intervalu, ki je enak času  $\tau$ , se magnetizacija za trenutek ponovno zbere ter postane koherentna. Na časovnem zapisu to vidimo kot odmev po  $\pi$  pulzu.

Pri ponavljanju tega koraka pa smo omejeni s tisto komponento spin-spinske relaksacije, ki povzroči nepovratno dekoherenco magnetizacije zaradi naključnih nihanj električnih gradientov. Ta relaksacija pa ne pomeni izgube energije sistema. Jedra so še vedno v višjem energijskem nivoju, le opazovati jih ne moremo več (slika 5).

Zaporedje, kjer  $\pi/2$  pulzu po času  $\tau$  sledi serija  $\pi$  pulzov, ločenih z  $2\tau$  zamika imenujemo Carr-Purcell-Meiboom-Gill sekvenco (CPMG). Pri tej sekvenci  $\pi$  pulze med posameznimi serijami dodatno fazno cikliramo, česar se iz slike ne vidi (slika 5). To počnemo zaradi zmanjšanja vpliva pulzov na detekcijski sistem. Rezultat te sekvence je prikazan na spodnji sliki (slika 5)



*Slika 5. Prikazano je značilno zaporedje Carr-Purcell-Meiboom-Gill sekvence. Viden je  $\pi/2$  pulz, FID po njem, ter skupina  $\pi$  pulzov skupaj s pripadajočimi odmevi. V novem zaporedju pulzov so  $\pi$  pulzi zamaknjeni za  $180^\circ$  glede na  $\pi$  pulze v prejšnji sekvenci (fazno cikliranje – se ne vidi na sliki).*

Preden lahko celotno sekvenco CPMG opravimo znova, moramo najprej počakati, da se jedra vrnejo v osnovno stanje (spin-mrežna relaksacija,  $T_1$ ). Energija vzbujenih jeder se pri tem izgublja v termičnih vibracijah okolice.

Pri moderni pulzni JKR ponavadi merimo odzive signala v takšni sekvenci. Dobljene segmente med  $\pi$  pulzi nato povprečimo, da povečamo S/N razmerje. Na koncu naredimo še diskretno Fourierjevo transformacijo, ki nam vrne spekter danega zapisa.

Zaradi majhne energije  $^{14}\text{N}$  kvadrupolne sklopitve, je opazovanje resonančnih frekvenc oteženo iz več razlogov. Potrebne so dokaj velike količine vzorca v tuljavi (največkrat nekaj g). Potrebno je nareediti več tisoč meritev, pri čemer je čas ponavljanja meritve omejen s spin-lattice relaksacijo ( $T_1$ ). Nujni so močni RF ojačevalniki, ki zagotovijo čim večji izkoristek prehoda med populacijami jeder v različnih kvadrupolnih energijskih

nivojih. Največje število prehodov pa je pri tem omejeno z Boltzmannovo porazdelitvijo. Zaradi majhnega signala je velika občutljivost detekcijskega sistema zelo pomembna. To pa vodi v težave zaradi šumov in motenj tako iz okolice kot tudi iz izzvanega vzbujevalnega dela sistema. Kljub temu se z optimizacijo nastavitev sistema ter pulznih sekvenc pogosto da te težave v veliki meri vsaj omili, če le energija  $^{14}\text{N}$  sklopitve ter relaksacija to dopuščata.

### 3.3 TRDNA SNOV

Trdna faza je definirana kot trden, homogen, fizikalno definiran ter ločljiv del sistema, ki je lahko kristalen ali amorfen. Sestavljena je iz atomov in molekul, ki se združujejo skupaj zaradi različnih interakcij (koalentna vez, kovinska vez, ionska vez, elektrostatske interakcije, vodikova vez, van der Walsove interakcije, hidrofobna vez). Pri čisti snovi je rezultat takšnih povezav praviloma kristalna struktura, ki je termodinamično stabilnejša od drugih stanj. Le če temu nasprotujejo neugodni pogoji ali procesi, se lahko tvori tudi amorfna snov. Pri zmeseh pa lahko enaki procesi vodijo do različnih oblik kokristalov, solvatov, ali amorfnih molekularnih trdnih disperzij.

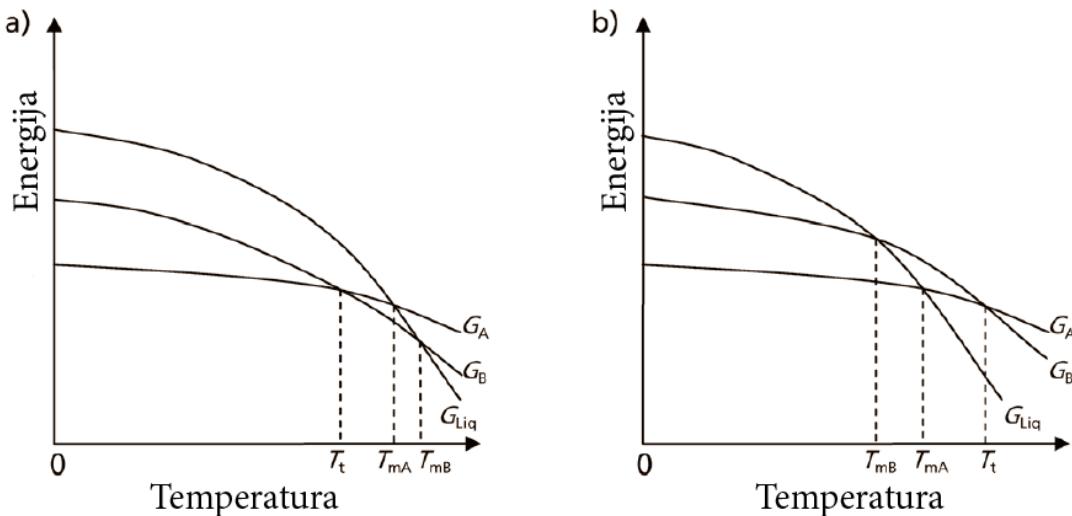
#### 3.3.1 KRISTALI

S pojmom kristal si predstavljamo trdno fazo, ki je sestavljena iz v treh dimenzijah ponavljačega se strukturnega elementa (9, 30). Najmanjši takšen ponavljači se element, ki še vodi do kristalov, imenujemo osnovna celica. Le ta je sestavljena iz atomov ali molekul. Urejenost gradnikov z enako osnovno celico je enaka v vseh delih kristala (»long-range order«). Edina izjema so možni lokalni defekti ali napake, ki nastanejo med rastjo kristalov. Mnogo kemičnih in fizikalnih lastnosti je odvisnih od kristalne strukture, zato je kristalografija zelo pomembna pri proučevanju teh lastnosti.

#### 3.3.2 POLIMORFI

Polimorfizem je sposobnost dane snovi, da kristalizira v več različnih kristalnih fazah, ki imajo ali različno ureditev kristalne strukture ali različno konformacijo molekule, lahko pa tudi oboje. Strogo gledano označuje pojem le kristale, katerih kristalna mreža je sestavljena le iz ene vrste molekul (Pri atomih enak pojav označujemo z alotropijo, npr. grafit in diamant)

Pojav lahko opredelimo glede na termodinamične, strukturne ali konformacijske lastnosti sistema (10-12, 29). Termodinamično lahko polimorfe razdelimo na enantiotrope in monotrope (slika 6). Enantiotropni sistemi lahko reverzibilno prehajajo eden v drugega v odvisnosti od temperature in tlaka. S pojmom monotropni sistem pa označujemo sistem, kjer so takšni prehodi nepovratni.



Slika 6. Diagram Gibbsove proste energije  $G$  v odvisnosti od temperature enantiotropnega (a) in monotropnega (b) sistema polimorfov A, B ter tekoče faze.  $T_t$  je temperatura prehoda med polimorfoma A in B,  $T_{mA}$  in  $T_{mB}$  pa sta temperaturi tališča A in B.

Gibbsova prosta energija polimorfov je definirana kot (enačba 12)

$$G = H - TS, \quad /12/$$

kjer je  $G$  Gibbsova prosta energija,  $H$  entalpija ter  $TS$  entropijski člen opazovanega sistema. Termodynamično je le en polimorf stabilen pri dani temperaturi in tlaku. Najbolj stabilna oblika ima pri tem najnižjo Gibbsovo prosto energijo.

Red stabilnosti polimorfov pri danih pogojih je definiran z razliko v Gibbsovi prosti energiji (enačba 13):

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S \quad /13/$$

Pri enantiotropnih sistemih se stabilni polimorfi pri različnih temperaturah in tlakih razlikujejo. Prehodi med temi stanji označujejo temperature prehoda, kjer je razlika v Gibbsovi prosti energiji enaka nič. Pri monotropnih sistemih pa je en polimorf vedno stabilnejši od drugega pri temperaturah, ki so nižje od tališča katerekoli oblike.

Za določevanje enantiotropnosti oziroma monotropnosti sistema nam pomagajo štiri termodinamična pravila (13). Najbolj uporabni in uporabljeni sta naslednji pravili:

- Pravilo prehajanja pravi: Če je prehod med polimorfima oblikama endotermen, potem sta obliki enantiotropni. Obratno velja: Če je prehod eksotermen, potem sta obliki monotropni.
- Naslednje pravilo trdi: Če ima polimorf z višjim tališčem nižjo talilno topoto, potem sta obliki enantiotropni. Obratno velja: Če ima polimorf z višjim tališčem višjo talilno topoto, potem sta obliki monotropni.

Obstajata dva načina, ki vodita do nastanka različne kristalne mreže. Molekula se lahko zлага v kristal na različne načine, kar vodi do različnih polimorfnih oblik. Pri tem se spreminja le mere in oblika osnovne celice. Polimorfizem te vrste označujemo kot »packing« polimorfizem. Pri konformacijskem polimorfizmu pa imamo molekule v različnih konformacijskih stanjih. V tem primeru je lahko osnovna celica bodisi različna bodisi enaka pri obeh polimorfih. Pri slednjem se lahko zgodi, da razlik na rentgenski difrakciji, ki zaznava spremembe osnovne celice, ne vidimo. V tem primeru moramo za razlikovanje uporabiti druge metode.

Polimorfe lahko dobimo z mnogimi metodami, npr. s sublimacijo, kristalizacijo iz taline, kristalizacijo iz superkritičnih tekočin, kristalizacijo iz nasičenih raztopin itd.

Zgoraj smo omenili, da je pri določeni temperaturi in tlaku termodinamično stabilna le ena polimorfna modifikacija. Vendar pa to ne preprečuje nastanka drugih termodinamično nestabilnih polimorfnih oblik. V primeru kristalizacije iz prenasičenih raztopin se proces začne z nukleacijo (20-22, 80-82). Nastal bo tisti polimorf, katerega kristalizacijska jedra bodo nastala najprej. Nastanek jeder je povezan z razmerjem volumen-površina le teh. Velika površina destabilizira nukleacijska jedra in teži k raztopljanju, kar napoveduje Kelvinova enačba (enačba 14).

$$\ln\left(\frac{p}{p_0}\right) = \frac{2\gamma V_m}{rRT} \quad /14/$$

$T$  je temperatura, pri kateri poteka proces nukleacije,  $p$  je parni tlak,  $p_0$  nasičeni parni tlak,  $\gamma$  je površinska energija ter  $r$  kritični radij nastajajočega jedra. Usmerjanje v nastanek različnih polimorfnih oblik tako lahko usmerjamo s pravilno izbiro topil in drugih

parametrov raztopine. Pri enem polimorfu tako povečamo negativni vpliv površine na stabilnost nukleacijskih jeder, medtem ko pri drugem ta vpliv zmanjšamo ter tako kinetično usmerjamo kristalizacijo. Polimorfne oblike se med sabo razlikujejo v vrsti fizikalno-kemijskih lastnosti (preglednica I).

*Preglednica I: Nekatere snovne lastnosti, ki se spremenijo zaradi različnih polimorfnih oblik (4).*

Pakiranje	Molarni volumen in gostota, lomni količnik, električna in topotna prevodnost, higroskopnost.
Termodinamične lastnosti	Temperatura tališča in sublimacije, notranja energija, entalpija, entropija, prosta energija in kemijski potencial, termodinamična aktivnost, parni tlak, topnost.
Spektroskopske lastnosti	Elektronski prehodi (vpliv na UV-VIS), vibracijski prehodi (vpliv na IR in Raman), rotacijski prehodi (FIR in mikrovalovi), prehodi jedrskih spinov (NMR, NQR).
Kinetične lastnosti	Hitrost raztopljanja, hitrost kemijskih reakcij, stabilnost.
Površinske lastnosti	Površinska prosta energija, medfazne napetosti, različne oblike (habitusi).
Mehanske lastnosti	Trdota, natezna trdnost, stistljivost, pretočnost, mešanje.

Preko merjenja sprememb lastnosti, navedenih v preglednici I, lahko zaznavamo morebiten nastanek novih polimorfov. Pri polimorfih se spremeni veliko lastnosti, vendar pa so te spremembe praviloma majhne in težko merljive. Zaradi tega je iskanje novih metod in tehnik, ki bi omogočile zvišanje občutljivosti ter razmerja signal-šum še vedno izredno aktualno.

### 3.3.3 AMORFNA SNOV

Amorfna snov ima poseben pomen pri proučevanju polimorfizmov (23-25). Ali lahko amorfno snov štejemo za polimorfno obliko, je odvisno od tega, kako smo definirali polimorfno fazo. V primerjavi s kristali amorfna snov nima daljnosežne urejenosti. Manjkata kristalna struktura in osnovna celica, ki bi bila enaka po vsem prostoru kristala. Ta lastnost amorfne snovi določa odsotnost značilnih ostrih vrhov pri rentgenski difrakciji.

Nadaljna analiza z diferencialno kalorimetrijo (DSC) pokaže temperaturo steklastega prehoda  $T_g$ . Pri tej temperaturi se poveča mobilnost molekul amorfne snovi, kar poveča hitrost raznih transformacij.

Vendar pa kljub odsotnosti kristalne mreže obstaja lokalna urejenost, ki je posledica intermolekularnih interakcij. Glede na vrsto te lokalne urejenosti lahko tudi amorfno snov razvrstimo na več podrazredov (neurejeni nanokristalinični, amorfni, steklasti ter mešani) (14).

Termodinamično je zaradi odsotnosti energije kristalne mreže povečana molarna entalpija, ki je večja kot pri kristalih. Hkrati je zaradi odsotnosti daljnosežne urejenosti, v primerjavi s kristali, povečana molarna entropija sistema. Manjša stabilnost in povečana reaktivnost nakazujeta, da se Gibbsova prosta energija poveča, kar pomeni, da se entalpijski prispevek amornega sistema bolj poveča kot entropijski (sledi iz enačbe 12). Drugače povedano, energija, ki je amorfemu sistemu na razpolago za vstop v različne procese, je pri njem povečana (15).

Zaradi tega je povečana npr. hitrost raztopljanja, adsorpcija vode, dojemljivost za kemične procese itd. Ker je amorfna snov termodinamično nestabilna, je dojemljivost sistema za prehod v stabilnejše kristalno stanje velika. Nastanek termodinamično stabilnega oz. nestabilnega polimorfa je ponovno pogojen s kristalizacijo in kinetičnimi procesi (26-28).

### **3.3.4 VPLIV STRUKTURE TRDNE SNOVI NA ELEKTRIČNI GRADIENT V OKOLICI**

#### ***JEDRA***

Zgoraj smo zapisali, da polimorfizem oz. različna razporeditev atomov vpliva na jedrske resonančne metode (preglednica I). To izvira iz dejstva, da spremenjena struktura snovi vpliva na tiste lastnosti sistema, ki vplivajo na sklapljanje jedrskih spinov z mrežno okolico.

Pri jedrski kvadrupolni resonanci povzroči spremenjena struktura spremembo električnega gradiента na položaju kvadrupolnega jedra. To pomeni, da se spremenijo energijski nivoji sklopitev, kar pomeni resonančni premik na spektru. Hkrati se spremenijo tudi parametri spin-spinske ter spin-mrežne relaksacije. To v končni fazi pripelje do razlik v frekvenci, amplitudi, relaksaciji ter temperaturni odvisnosti. Lahko pa se sistem celo tako spremeni, da jedrske kvadrupolne resonance preprosto ne moremo več opaziti.

Metoda je zelo občutljiva na kakršnekoli spremembe (37-39). Tudi v primeru, da bi dva polimorfa imela enake resonančne frekvence, je gotovo, da bi bile razlike v položaju drugih JKR črt, temperaturni odvisnosti, odvisnosti od tlaka, relaksacijskih časih, širini črt itd.

### **3.4 JEDRSKA KVADRUPOLNA RESONANCA V FARMACIJI**

Za farmacijo so zelo pomembni polimorfi, hidrati ter amorfne snovi. Katera oblika je izbrana in vgrajena v farmacevtsko obliko, je odvisno predvsem od želenega biofarmacevstkega profila uporabljeni farmacevtske oblike. S spremenjanjem oblike vgrajene učinkovine farmacevtska industrija spreminja lastnosti farmacevtske oblike, kot so stabilnost, hitrost raztplavljanja in topnost, procesibilnost itd. Hkrati se s spremeno izrabo morebitnih drugačnih polimorfnih oblik proizvajalci izogibajo patentnim preprekam. Pri tem jim znanje o novih oblikah učinkovin omogoča tvorjenje patentnega portfelja, kar je pomembna sestavina uspeha na konkurenčnem trgu.

Razvoj zdravila se ponavadi začne z obširnim iskanjem spojine vodnice. Temu sledi optimizacija dane strukture glede na farmakološki učinek, fizikalne lastnosti ter sintezne zmožnosti. Uspeh v tem delu omogoči iskanje farmacevtske oblike (FO), ki bi najbolj učinkovito in uporabniku prijazno dostavila zdravilno učinkovino v centralni krvni obtok in na mesto delovanja. Hkrati z drugim delom se začnejo tudi razna testiranja, ki segajo od toksikoloških do kliničnih testiranj. V končni fazi je dorečena tudi proizvodna pot učinkovine ter farmacevtske oblike v industrijskem merilu vključno s testi, ki omogočajo proizvajalcem zagotavljati kakovost, regulatornim organom pa nadzor nad samim zdravilom. Metode, ki nam omogočajo takšen nadzor, so mnoge ter raznovrstne. Uporaba najbolj pomembnih ter pogosto uporabljenih je opisana v raznih farmakopejah. Za proučevanje polimorfov predpisuje npr. britanska farmakopeja sledeče metode (16):

- rentgenska difrakcija,
- rentgenska difrakcija posameznih kristalov,
- termična analiza (DSC, TGA, termomikroskopija),
- mikrokalorimetrija,
- adsorpcija vlage,
- optična in elektronska mikroskopija,
- NMR trdnih snovi,
- IR absorpcijska spektrofotometrija,
- Ramanska spektrometrija,
- merjenje topnosti ter intrinzične hitrosti raztopljanja,
- merjenje gostote.

Najboljša metoda iz naštetega sklopa je rentgenska difrakcija (17, 30-33). Uporaba monokristalne metode je zlati standard določevanja osnovne celice kristalne strukture. V primeru, da je težko nareediti kristal primerne velikosti, se uporabi praškovna rentgenska difrakcija. V farmacevtski industriji se kot polizdelke pretežno izdeluje zdravilne učinkovine z delci majhnih dimezij (praškaste oblike), ki zagotavljajo določen biofarmacevtski profil končnega zdravila. Zato se za kontrolo rutinsko uporablja predvsem rentgenska praškovna difrakcija, medtem ko se za iskanje polimorfov uporablja rentgenska difrakcija v navezi z drugimi zgoraj naštetimi metodami.

Proizvodnja čiste zdravilne učinkovine je problematična s stališča proizvodnih procesov (18). Različnim postopkom zmanjševanja velikosti delcev je skupna lastnost to, da v sistem vnašajo energijo, ki lahko povzroči različne fazne transformacije trdne snovi. Tudi izdelava končne farmacevtske oblike z vgrajeno učinkovino je podvržena procesom, ki v sistem vnašajo energijo ter tako lahko povzročajo fazne spremembe zdravilne učinkovine (19). Zagotavljanje ustreznih lastnosti sestavin, polizdelkov ter končnih izdelkov je zato zelo pomembno.

Zaradi posebne vloge farmacije v družbi in posledično regulatornih pritiskov, je prisoten trend odkrivanja novih metod in tehnik karakterizacije trdne snovi. V zadnjem času so tako postale pomembne »near-IR« (NIR) ter »far-IR« (oz. teraherčna spektroskopija, THz) (34-36).

Posebno pozornost ima pri tem proučevanje učinkovine v končni FO. Pri tem na rezultate klasičnih zgoraj naštetih metod vplivajo vse k učinkovini dodane sestavine. Zato je zelo pomembna predpriprava vzorcev, ki praviloma pomeni uničenje same FO. To pa lahko povzroči spremembe proučevanega vzorca, ki zato lahko ne ponazarja dejanskega stanja v sami FO. Zato sta pomembni lastnosti izbrane analizne metode tudi nedestruktivnost ter neinvazivnost, ki omogočata opazovanje zdravilne učinkovine neposredno v končni farmacevtski obliki.

Jedrska kvadrupolna resonanca predstavlja pomemben korak pri proučevanju trdne snovi, hkrati pa je tudi nedestruktivna ter neinvazivna metoda, ki omogoča opazovanje proučevanega sistema (trdna FO, praškasta oblika učinkovine, trdna zmes), brez predpriprave vzorcev. Vplivi na signal so možni le, če imajo posamezne sestavine kvadrupolne resonance na enakem mestu kot proučevana snov.

Dosedanja proučevanja JKR s poudarkom na farmaciji so bila, zaradi praviloma močnih odzivov, osredotočena na  $^{35}\text{Cl}$  (38-41). V zadnjem času se je z napredkom tehnologije izboljšalo tudi iskanje ter merjenje šibkejših JKR odzivov (42-50). Tako so postala smotrna tudi opazovanja  $^{14}\text{N}$  JKR.

Metoda nam lahko poda odgovore o identiteti, obliku ter količini proučevane snovi v zmesi.

## 4 NAMEN DELA

V okviru te diplomske naloge bomo poskušali s pomočjo metode  $^{14}\text{N}$  jedrske kvadrupolne resonance kvalitativno in kvantitativno ovrednotiti pripravljene vzorce treh zdravilnih učinkovin: sulfanilamida, piroksikama ter nifedipina. Preverili bomo primernost metode, da kvalitativno razlikuje med različnimi stanji trdnih učinkovin: kristaliničnost, amorfnost, polimorfizem. Proučevali bomo tudi koncentracijsko odvisnost  $^{14}\text{N}$  kvadrupolnega odziva ter možnost uporabe za proučevanje dinamičnih procesov v trdni snovi.

Končni rezultati kvalitativnih opazovanj bodo analizirani spektri na tržišču dobavljivih ter prekristaliziranih oblik sulfanilamida ter piroksikama. Z njihovo primerjavo bomo ugotavljeni sposobnosti metode, da zazna razlike med različnimi oblikami posamezne učinkovine. Za primerjavo nam bodo služili rezultati DSC ter FT-IR meritev.

Kvantitativno bomo proučevali koncentracijski odziv piroksikama I v mešanici z brezvodno obliko.

Opazovali bomo še dinamični proces nastajanja kristalinične oblike nifedipina I iz steklaste (amorfne) oblike pri določeni temperaturi. Prikazana bo odvisnost naraščanja signala od časa pri določeni temperaturi.

Meritve DSC in FT-IR bomo opravili na Fakulteti za farmacijo, (FFA) Univerze v Ljubljani,  $^{14}\text{N}$  JKR odzive pa določili na Inštitutu za matematiko, fiziko in mehaniko (IMFM), Ljubljana.

## 5 MATERIALI IN METODE

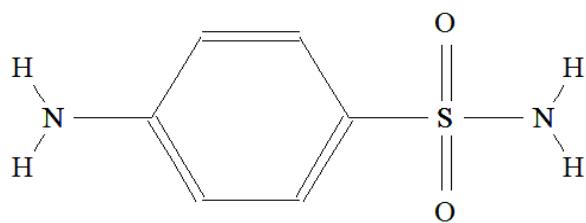
### 5.1 MATERIALI

#### 5.1.1 UPORABLJENE ZDRAVILNE UČINKOVINE

- sulfanilamid, min. 99%, Sigma-Aldrich, Nemčija
- piroksikam monohidrat, dobavitelj Krka, Novo mesto, Slovenija
- piroksikam, mikroniziran, dobavitelj Krka, Novo mesto, Slovenija
- nifedipin, Krka, dobavitelj Novo mesto, Slovenija

Za proučevanje s  $^{14}\text{N}$  JKR mora imeti molekula v strukturi vsaj en dušikov atom. Farmacevtske učinkovine so zato zelo primerne za opazovanje, saj ima velika večina v molekuli vsaj en dušikov atom. Za proučevanje smo si izbrali tri zdravilne učinkovine: sulfanilamid (kemoterapeutik), piroksikam (nesteroидно protivnetno delovanje) ter nifedipin ( antihipertenziv, antagonist kalcijevih kanalčkov). Vse tri molekule vsebujejo vsaj dva atoma dušika.

### 5.1.1.1 SULFANILAMID

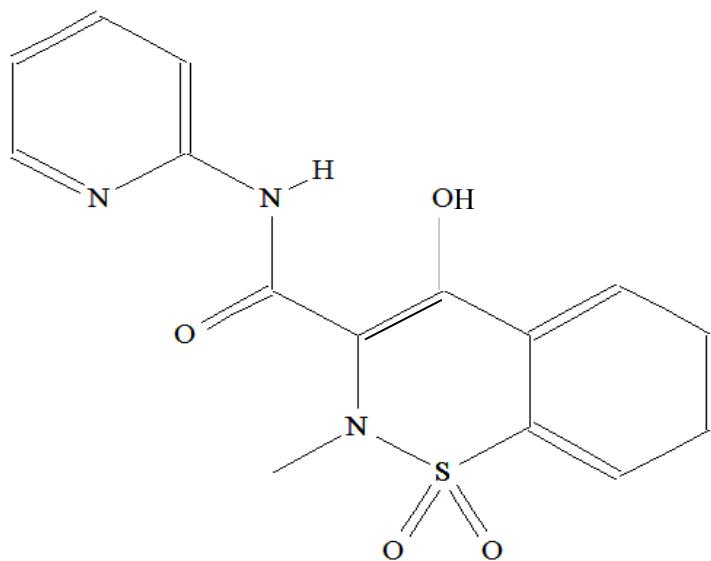


Slika 7. Strukturna formula sulfanilamida.

Tri najbolj znane polimorfne oblike sulfanilamida so alfa, beta in gama. Njihove termodinamične lastnosti je opazovalo več avtorjev (51-56). Najbolj stabilna pri sobni temperaturi je beta oblika (prizme,  $T_{TAL}=156^{\circ}\text{C}$ ). Alfa je nestabilna (monotropna) pri vseh temperaturah in tlakih (iglice,  $T_{TAL}=152^{\circ}\text{C}$ ). Gama pa je stabilna pri zvišani temperaturi (ploščice,  $T_{TAL}162^{\circ}\text{C}$ ). Molekule v kristalni mreži imajo približno enako konformacijo, tako da je polimorfizem sulfanilamida primer položajnega (konformacijskega) polimorfizma (51). Pri segrevanju  $\alpha$  in  $\beta$  poteče pretvorba v  $\gamma$  v temperaturnem intervalu 90-135°C. Na tržišču dostopen sulfanilamid je v beta obliki.

$^{14}\text{N}$  JKR frekvence obeh dušikovih atomov sulfanilamida beta so znane (57). Zaradi močnega signala ga v laboratoriju pogosto uporabljam pri preverjanju delovanja NQR sistemov.

### 5.1.1.2 PIROSIKAM



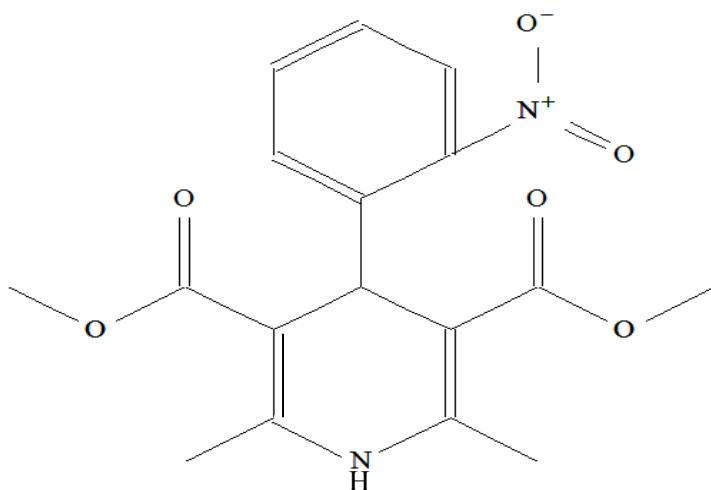
Slika 8. Strukturna formula piroksikama.

Več avtorjev je obravnavalo polimorfe piroksikama (59-62). Znane so tri oblike : I, II in III.

Piroksikam I se imenuje tudi beta oz. kubična oblika (kljub temu, da je kristalni sistem monoklinski). Njegovo tališče je pri  $202,6^\circ\text{C}$  in je termodinamično najstabilnejša oblika pri vseh temperaturah in tlakih. Oblika II ima tališče pri  $199,7^\circ\text{C}$  (alfa, iglice, monoklinski), medtem ko pri III tališča in osnovne celice še niso uspeli določiti.

Meritev odziva  $^{14}\text{N}$  kvadrupolnih frekvenc v pregledu literature nismo našli.

### 5.1.1.3 NIFEDIPIN



Slika 9. Strukturna formula nifedipina.

Pri nifedipinu so znane tri polimorfne oblike: I (alfa), II (beta) in III (63-68). Oblika I ima tališče pri  $172^\circ\text{C}$ , II pri  $163^\circ\text{C}$  ter III pri  $134^\circ\text{C}$ . Pri normalnih pogojih in vse do temperature tališča pri  $172^\circ\text{C}$  je najstabilnejša oblika I. Ostali dve obliki sta pri teh pogojih monotropni glede na I, a enantiotropni med sabo. Pri temperaturah nižjih od  $56^\circ\text{C}$  je stabilna oblika III, nad to in v območju do  $120^\circ\text{C}$ , pa je stabilna oblika II. V območju  $120$ - $150^\circ\text{C}$  preide vsa oblika II v I.

Kristalizacijo iz steklaste oblike nifedipina je proučevalo veliko avtorjev (63-79). To sledi iz dejstva, da so se vsa proučevanja polimorfizma nifedipina začela s pripravo steklaste oblike. Pri segrevanju amorfna oblika najprej kristalizira v II (v temperaturnem območju  $90$ - $120^\circ\text{C}$ ), ki nato preide v I med  $120$ - $150^\circ\text{C}$  (65,66,68,71).

Meritev odziva  $^{14}\text{N}$  kvadrupolnih frekvenc v pregledu literature nismo našli.

### ***5.1.2 OSTALE UPORABLJENE SNOVI***

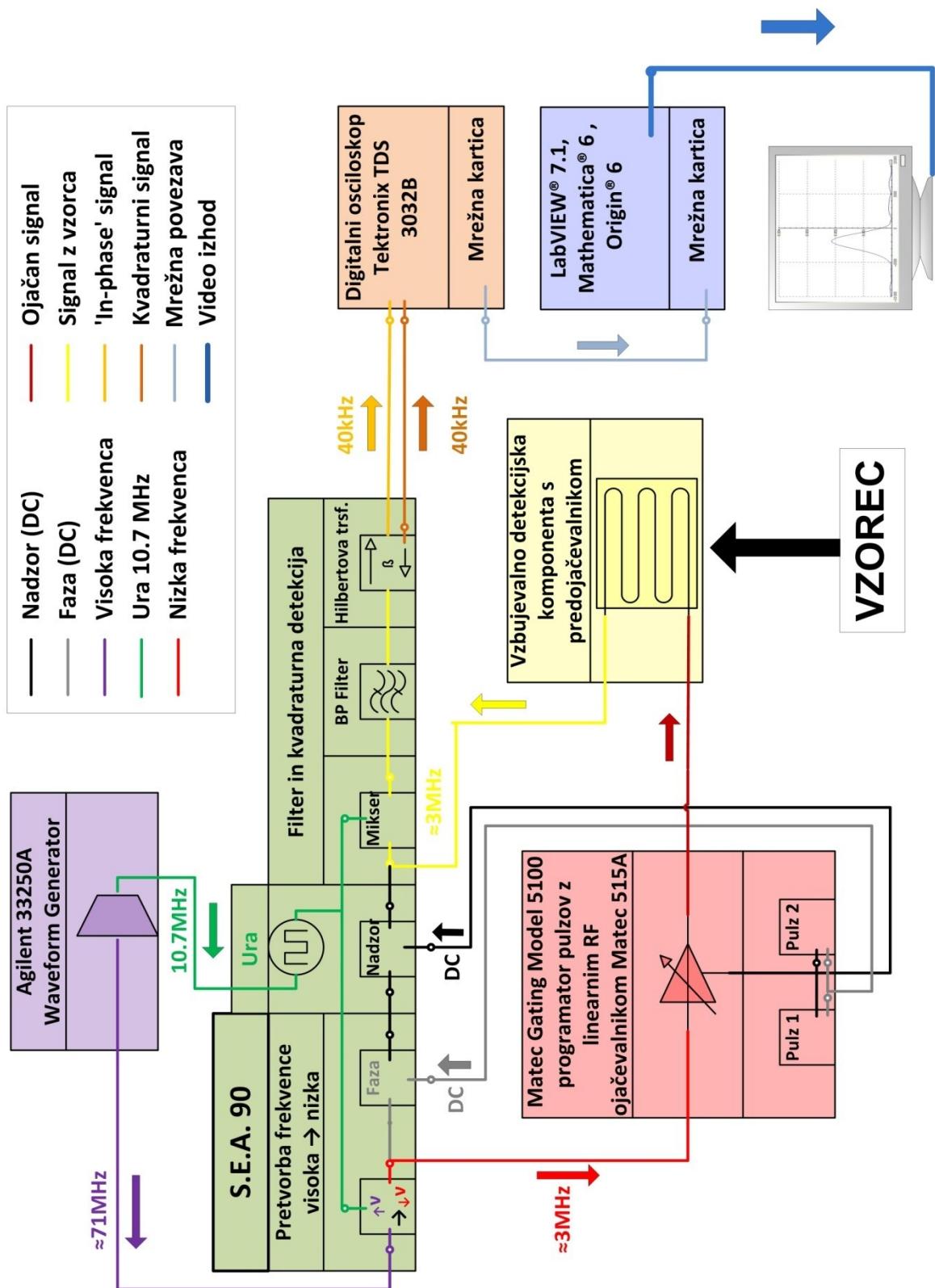
- 1-butanol, min. 99%, Riedel-de Haen AG, Seelze-Hannover, Nemčija
- etanol, Ph. Eur. 5th (96%), Kefolab, Ljubljana, Slovenija
- absolutni etanol,  $\geq 99,9\%$ , Merck KGaA, Darmstadt, Nemčija
- 1,2-dikloroetan, Merck KGaA, Darmstadt, Nemčija
- prečiščena (deionizirana) voda

### ***5.1.3 APARATURE IN MATERIALI***

- digitalna tehnica, Exacta 1200EB, Tehnica, Železniki, Slovenija
- običajni celulozni filtrirni papir
- analizna tehnica, Mettler Toledo AG245, Mettler-Toledo GmbH, Švica
- Pyris II DSC, PerkinElmer Inc., Massachusetts, ZDA
- Thermo Nicolet Nexus FT-IR, Thermo Fisher Scientific Inc., Massachusetts, ZDA
- FT-IR nastavek, ATR DuraSamplIR, Smiths Detection Group Ltd., Velika Britanija
- termostatirani električni grelnik s senzorjem temperature in magnetnim mešalom, RCT Basic, IKA Werke GmbH & Co. KG, Nemčija
- magnet, D=20mm,  $\Phi=6\text{mm}$
- digitalni termometer, GHT 175/MO, Greisinger Electronic, Germany

➤ NQR sistem 1 (sistem 1) (slika 10)

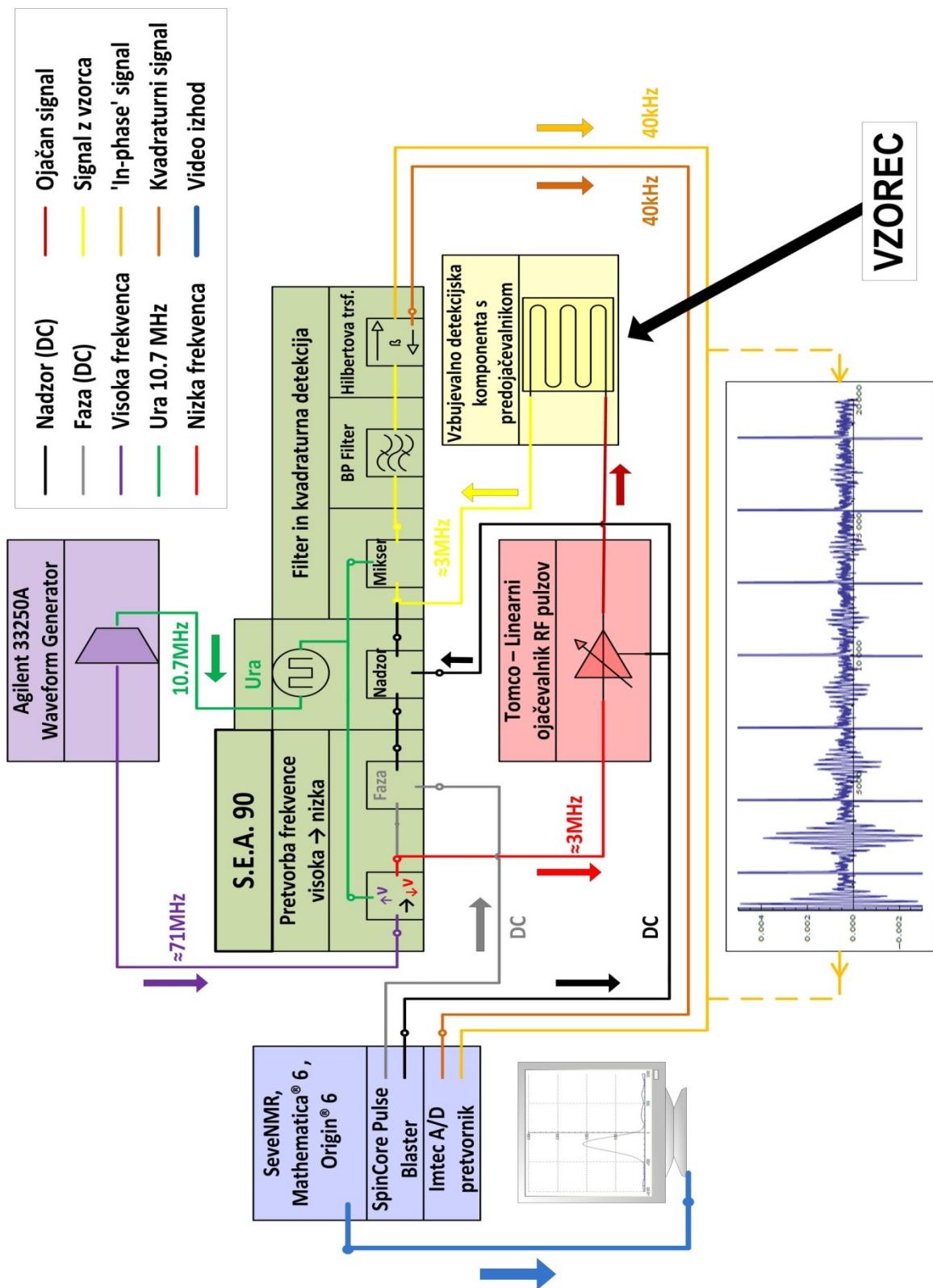
- ❖ frekvenčni generator, Agilent 33250A, Agilent, Inc., Kalifornija, ZDA
- ❖ spektrometer, S. E. A. 89, Soluzioni elettroniche avanzate, Pila, Italy
- ❖ generator pravokotnih pulzov ter 2kW linearni radiofrekvenčni ojačevalnik pulzov, (Matec Gating Modulator Model 5100 s "plug-in" stopnjo Matec Model 515A - RF Gated Amplifier 0.5 MHz - 30 MHz), Matec
- ❖ RF vzbujevalno detekcijska komponenta s tuljavo, dvema vrtljivima kondenzatorjem ter 40dB predojačevalnikom
- ❖ osciloskop Tektronix TDS 3032B, Tektronix, Inc., Teksas, ZDA
- ❖ PC zajem in obdelava podatkov
  - zajemanje zapisov z osciloskopa, LabView 7.1, National Instruments, Inc, Teksas, ZDA
  - obdelava in prikaz podatkov, Mathematica 6, Wolfram Research, Inc, Illinois, ZDA
  - analiza podatkov, Origin 6, OriginLab Corporation, Massachusetts, ZDA



Slika 10. Shema delovanja NQR sistema 1

➤ NQR sistem 2 (sistem 2) (slika 11)

- ❖ frekvenčni generator Agilent 33250A, Agilent Inc., Kalifornija, ZDA
- ❖ spektrometer S.E.A. 89, Soluzioni elettroniche avanzate, Pila, Italy
- ❖ 500W linearji radiofrekvenčni ojačevalnik pulzov, Tomco Inc., Avstralija
- ❖ RF vzbujevalno detekcijska komponenta s tuljavo, dvema vrtljivima kondenzatorjem ter 40dB predojačevalnikom
- ❖ PC proženje pulzov ter zajem in obdelava podatkov
  - računalniške kartice
    - generator pulzov PulseBlaster, SpinCore Technologies, Inc., Florida, ZDA
    - A/D zajem kartica T3012, Imtec
  - programska oprema
    - nadzor nad proženjem pulzov ter zajemanjem odzivov, SeveNMR, Inštitut Jožef Stefan, Ljubljana
    - obdelava in prikaz podatkov, Mathematica 6, Wolfram Research, Inc, Illinois, ZDA
    - analiza podatkov, Origin 6, OriginLab Corporation, Massachusetts, ZDA



Slika 11. Shema delovanja NQR sistema 2

## 5.2 METODE

### 5.2.1 PRIPRAVA RAZLIČNIH OBLIK ZDRAVILNIH UČINKOVIN

#### 5.2.1.1 PRIPRAVA SULFANILAMIDA ALFA

Dobavljeni sulfanilamid smo prekristalizirali v n-butanolu (58). Nastale kristale smo analizirali z DSC, FT-IR ter  $^{14}\text{N}$  JKR.

#### 5.2.1.2 PRIPRAVA SULFANILAMIDA BETA

Dobavljeni sulfanilamid smo prekristalizirali v deionizirani vodi (58). Nastale kristale smo analizirali z DSC ter FT-IR. Preverili smo istovetnost dobavljenega sulfanilamida s prekristalizirano beta obliko.

#### 5.2.1.3 PRIPRAVA SULFANILAMIDA GAMA

Dobavljeni sulfanilamid smo prekristalizirali v 96% etanolu (58). Nastale kristale smo analizirali z DSC, FT-IR ter  $^{14}\text{N}$  JKR.

#### 5.2.1.4 PRIPRAVA PIROSIKAMA I ( $\beta$ OZ. KUBIČNA OBLIKA)

Dobavljeni piroksikam smo prekristalizirali v 1,2-dikloroetanu (59). Nastale kristale smo uporabili pri merjenju FT-IR ter  $^{14}\text{N}$  JKR odzivov.

#### 5.2.1.5 PRIPRAVA PIROSIKAMA II ( $\alpha$ OZ. IGLIČNA OBLIKA)

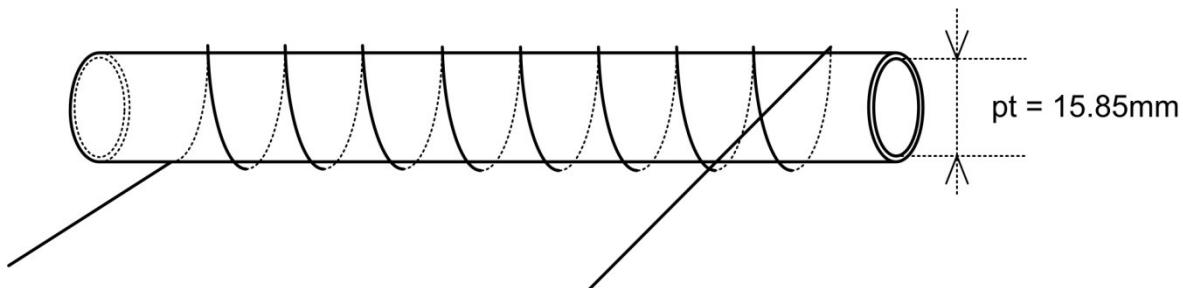
Dobavljeni piroksikam smo prekristalizirali v absolutnem etanolu (59). Nastale kristale smo uporabili pri merjenju FT-IR ter  $^{14}\text{N}$  JKR odzivov.

### 5.2.1.6 PRIPRAVA STEKLASTE OBLIKE NIFEDIPINA

Okrog 7g nifedipina smo natehtali v 50mL čašo, ki smo jo postavili v oljno kopel, postavljeni na termostatiran grelnik IKE RCT Basic z magnetnim mešalom. Temperatura je bila nastavljena na 182°C, število obratov magnetnega mešala pa na 280Hz. Ko se je vsa trdna snov stalila, smo talino prelili v stekleno epruveto (100x15,75mm). To pa smo nato ohlajevali v curku mrzle tekoče vode. Pri tem je nastala steklasta oblika nifedipina, ki je bila rumene barve. Masa steklastega nifedipina v epruveti je bila okrog 6g. Vzorec smo uporabljali pri  $^{14}\text{N}$  JKR proučevanju prehajanja steklaste oblike v nifedipin I.

### 5.2.2 PRIPRAVA VZORCEV ZA MERJENJE $^{14}\text{N}$ JKR ODZIVOV

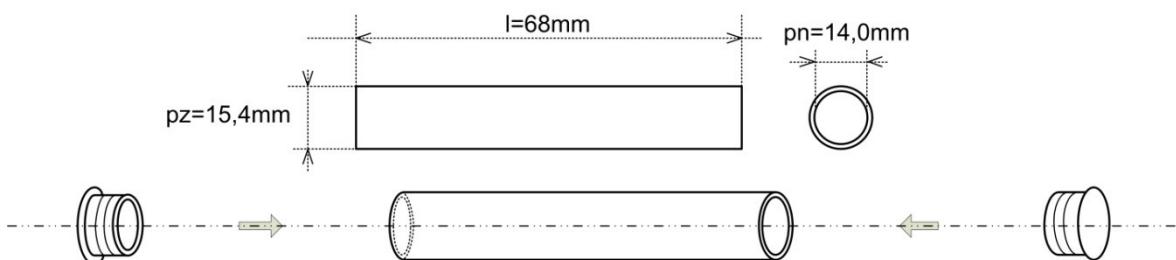
Velikost vzorcev za proučevanje kvadrupolnih odzivov je morala zadostiti velikostnim zahtevam, ki jih je predstavljala omejena velikost tuljave v vzbujevalno-detekcijski komponenti (slika 12).



Slika 12. Shema navitja tuljave vzbujevalno-detekcijske komponente obeh NQR sistemov s prikazanim največjim premerom vsebnika proučevane snovi.

Proučevane snovi smo tako polnili v dva vsebnika. Prvi je bil sestavljen iz 68mm dolge neprozorne cevi iz plastične mase ( PE ) z zunanjim premerom 15,4mm ter dveh končnih plastičnih zamaškov (slika 13).

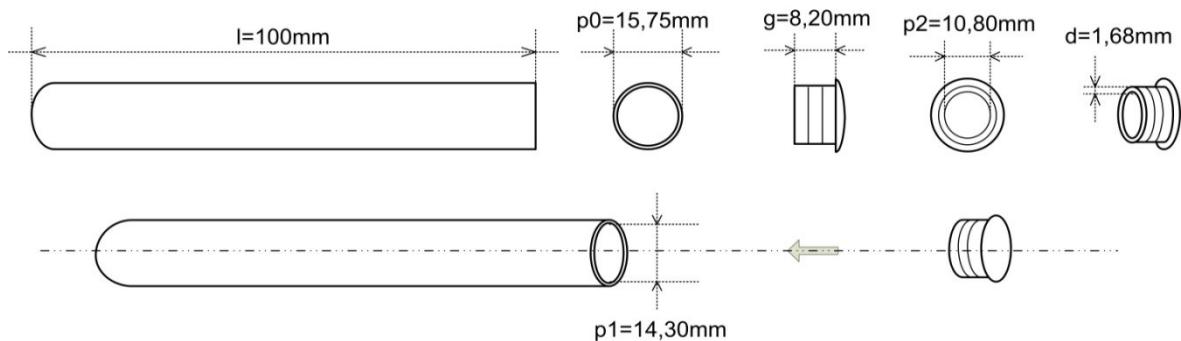
Vsebnik 1



Slika 13. Shema vsebnika 1. pn, pz ter l označujejo notranji in zunanji premer ter dolžino

Drugi vsebnik je bil sestavljen iz tankostenske steklene epruvete mer 100x15,75mm, zaprte s plastičnim zamaškom ali ovojem iz teflonskega traku. Takšen vzorec smo lahko segrevali ob hkratnem opazovanju morebitnih sprememb. Epruvetam smo lahko tudi zelo natančno določili njihov volumen. To nam je omogočilo zelo natančno določitev gostote vzorcev, kar smo potrebovali pri preverjanju odvisnosti odziva od koncentracije resonirajočih dušikovih jeder (slika 14).

### Vsebnik 2



Slika 14. Shema vsebnika 2. l označuje dolžino, p0 zunanji premer, p1 ter p2 notranja premera, d debelino ter g globino.

#### 5.2.2.1 POLNITVE VZORCEV

Maso učinkovine v vsebniku smo določili z računanjem razlike v masah vsebnika pred in po polnjenu. Gostoto smo, razen pri koncentracijski odvisnosti signala piroksikama, grobo ocenili s pomočjo dimenzij vsebnikov (preglednice II-VI).

#### *Sulfanilamid*

Preglednica II. Polnitev vzorcev sulfanilamida (dobavljena ter prekristalizirani obliki). Navedene so mase v vsebniku in grobo ocenjene gostote.

Topilo prekristalizacije	Vsebnik	Masa v vsebniku [g]	Gostota [g/cm <sup>3</sup> ]
Dobavljena oblika, Beta	1	6,77	0,8
n-butanol	2	4,21	0,4
etanol 96%	2	3,46	0,4

Oba prekristalizirana vzorca imata približno polovično gostoto polnitve v primerjavi z referenčnim vzorcem (preglednica II). V vsebnike sta se težko polnila zaradi velikih kristalov, ki so motili vnašanje.

## **Piroksikam**

Najprej smo napolnili dva vsebnika 2, s katerima smo iskali resonančne frekvence (preglednica III).

*Preglednica III. Polnitev vzorcev obeh dobavljenih oblik piroksikama. Navedene so mase v vsebniku in grobo ocenjene gostote.*

Dobavljen piroksikam	Vsebnik	Masa v vsebniku [g]	Gostota [g/cm <sup>3</sup> ]
oblika I	2	8,45	0,7
monohidrat	2	9,65	0,8

Nato smo napolnili serijo petih vsebnikov 2, ki smo jim natančno določili volumen in maso. Epruvetam smo volumen določili s pomočjo polnilnih in merilnih pipet. Plastičnim pokrovčkom smo s kljunastim merilom natančno izmerili njihove dimenzijske (g, p2 in d na slika 14) ter izračunali volumen. Zatem smo od volumna epruvet odšteli izračunani volumski odbitek zamaškov ter tako dobili dejanski volumen vsebnika.

Potem smo pripravili 11, 25, 50, 75 ter 100% mešanice oblike I z monohidratom ter z njimi napolnili vsebnike. Stehtali smo tako pripravljene vzorce ter odšteli maso praznih vsebnikov. Dobijeno celokupno maso smo pomnožili z masnimi deleži oblike I, tako da smo dobili maso oblike I v posameznem vsebniku (preglednica IV, stolpec 3). Maso te smo nato delili z dejanskim volumnom vsebnika (preglednica IV, 4 stolpec), da smo prišli do gostote (preglednica IV, stolpec 5). Te vrednosti smo nato uporabili pri proučevanju zveze med odzivom in koncentracijo.

*Preglednica IV Polnitev vzorcev za določevanje koncentracijske odvisnosti <sup>14</sup>N JKR signala piroksikama I. Vsi vzorci so polnjeni v vsebnikih 2. Poleg masnega deleža oblike I v zmesi so navedeni še masa oblike I v vsebniku, volumen vsebnika ter gostota izračunana iz njiju.*

Vzorec	W oblike I v zmesi	Masa oblike I [g]	V vsebnika [mL]	Gostota [g/cm <sup>3</sup> ]
1	0,11	1,60	15,16	0,11
2	0,25	3,76	15,26	0,25
3	0,50	7,15	15,28	0,47
4	0,75	10,11	15,33	0,66
5	1,00	12,20	15,27	0,80

S prekristaliziranimi vzorci piroksikama smo napolnili še dva vsebnika 2 (preglednica V). Ta dva vzorca smo uporabili pri kvalitativni primerjavi obeh oblik. Kot referenca je služil 100% vzorec piroksikama I, pripravljen v seriji vzorcev za proučevanje koncentracijske odvisnosti odziva (preglednica IV, vrstica 5).

*Preglednica V. Polnitev vzorcev kupljenih oblik piroksikama. Navedene so mase v vsebniku in grobo ocenjene gostote.*

Topilo prekristalizacije	Vsebnik	Masa v vsebniku [g]	Gostota [g/cm <sup>3</sup> ]
Dobavljeni obliki I	2	12,20	0,80
1,2-dikloroetan	2	1,90	0,2
absolutni etanol	2	4,30	0,4

### **Nifedipin**

Za proučevanje nifedipina smo napolnili dva vsebnika (preglednica VI). Prvega smo uporabili za iskanje ter kot referenco, drugega pa za proučevanje prehodov steklastega nifedipina v obliko I. Glede na postopek priprave steklastega nifedipina (naveden zgoraj) smo napolnili vsebnik 2. Tokrat smo ga zaprli s teflonskim trakom, ki zdrži temperature, pri katerih smo kasneje greli vzorec.

*Preglednica VI. Polnitev vzorcev nifedipina. Navedene so mase v vsebniku in grobo ocenjene gostote.*

	Vsebnik	Masa v vsebniku [g]	Gostota [g/cm <sup>3</sup> ]
Obliki I	1	3,12	0,4
Steklasti nifedipin	2	6,33	0,7

### **5.2.3 MERITVE VZORCEV**

#### **5.2.3.1 DSC**

DSC meritve so bile opravljene s Pyris II instrumentom. Hitrost segrevanja je bila nastavljena na  $5^{\circ}\text{C}/\text{min}$ . Opazovali smo v temperaturnih intervalih:

- 20-170°C sulfanilamid
- 20-180°C nifedipin
- 20-210°C piroksikam

Grafično obdelavo zapisov smo naredili v Originu 6. Zapise smo prikazali na skupnem grafu. Temperaturne intervale, kjer so bile prisotne pretvorbe, smo dodatno povečali.

#### **5.2.3.2 FT-IR**

Opazovali smo ATR IR odziv vzorcev v intervalu  $4000\text{-}600\text{ cm}^{-1}$ . Vsi vzorci so bili pomerjeni trikrat. Spektre smo sešteli in povprečili v Originu 6. Delov spektrov brez vrhov nismo prikazali, da smo tako izboljšali preglednost.

Zaradi različnih lastnosti, oblik ter velikosti sestavnih delcev opazovanih vzorcev (večji kristali, praški, amorfna snov), je bilo težko doseči enake pogoje merjenja vzorcev na ATR mizici. Posledično je prišlo do večjih odstopanj pri absorbanci posameznih meritev. Kvalitativna primerjava je bila tako otežena. Zato smo si pomagali z normalizacijo. Pri tem postopku smo spekter delili z vrednostjo najvišjega vrha. Tako smo pri vseh spektrih dobili razpon višin med 0 in 1, kar nam je omogočilo lažje razbrati morebitne razlike.

### 5.2.3.3 $^{14}\text{N}$ JKR

Za skrajšanje časa iskanja  $^{14}\text{N}$  JKR so bili vsi vzorci najprej pregledani na IJS z metodo dvojne resonance. Pri tem se opazuje odvisnost hitrosti relaksacije vodikovih  $^1\text{H}$  jader od sklopitev z  $^{14}\text{N}$  kvadrupolnimi jedri. Relaksacija vodikovih jader je najhitrejša, ko se frekvenci precesije vodikovih ter kvadrupolnih dušikovih jader izenačita v časovno pojemajočem zunanjem magnetnem polju. S to metodo se lahko določi okvirna območja, kjer se lahko nahajajo kvadrupolne resonančne frekvence  $^{14}\text{N}$ .

Natančnejšo določitev  $^{14}\text{N}$  resonančnih frekvenc smo nato opravili z obema NQR sistemoma (sliki 10 in 11). Glavna razlika med njima je v sposobnosti tvorjenja sekvence pulzov v hitrem zaporedju pri NQR sistemu 2. To ob ugodnih pogojih ( $T_2$  dovolj dolg) omogoča mnogokratno izboljšanje S/N razmerja ob hkratnem občutno krajšem celotnem merjenju odziva. NQR sistem 1 je zmogel tvoriti le hitro zaporedje dveh pulzov,  $\pi/2$  in  $\pi$ .

Pri sistemu 1 smo zapise meritev prebirali z osciloskopa prek mrežne povezave. Pred začetkom merjenja smo morali napisati nadzorni program, ki bo nadziral povezavo ter zajemanje podatkov z osciloskopa. To smo storili v LabView 7.1. Pri sistemu 2 je zajemanje opravila A/D vtična kartica računalnika, ki je bila pod nadzorom SeveNMR programa. Končni rezultat pri obeh sistemih je bil datotečni zapis kvadrupolnih odzivov. Za obdelavo teh zapisov smo z Mathematica 6 spisali obdelovalne procedure. Rezultat te obdelave smo nato prikazali v programu za tabelarično analizo podatkov Origin 6.

Obdelava podatkov se je med obema sistemoma razlikovala v koraku segmentacije. To je postopek, pri katerem smo razrezali časovni zapis na enako velike segmente, ki smo jih potem sešteli in delili s številom vseh segmentov (slika 16).

Nadaljnji koraki so bili po tej točki enaki za oba sistema (primerjava slik 15 in 17). Izrezali smo ožji časovni interval, ki ne vsebuje začetnega izzvenevanja sistema in morebitne ponovne vključitve naslednjega vzbujevalnega pulza. V naslednjem koraku smo izrezani del povprečili ( $\frac{\sum \text{amplitud}}{\text{število točk}} = 0$ , s tem korakom smo odpravili morebitni zamik po y). Po tem koraku smo imeli zapis, ki je bil na obeh koncih ostro odrezan. Ker to poslabša spekter, smo v naslednjem koraku množili z oknom, ki ni nič drugega kot zvonasta krivulja, ki konca zapisa zvezno pripelje do ničle (83). Pri tem hkrati tudi zatre morebitne

frekvence, ki bi se pojavile na koncih zapisa. Sledila je podložitev z ničlami (t. i. »zero padding«), ki je povečala resolucijo spektra (slika 15, koraki 3-4; slika 17, koraki 4-5) (83).

V naslednjem koraku smo tvorili spekter z diskretno Fourierjevo transformacijo (FFT). Dobljeni spekter smo razrezali na sredini ter ga prenesli na naslednjo stran ter združili (sliki 15 in 17; zadnji korak ). Tako smo dobili končni spekter. Iz njega smo odčitali višino najvišjega vrha ter njegov položaj. Pri piroksikamu in nifedipinu smo višino vrhov uporabili za prikazovanje različnih zvez med odzivom in različnimi parametri.

### ***Koncentracijska odvisnost piroksikam signalu pri obeh $\nu_+^{14}N$ JKR, t.j. 2587 ter 3439kHz***

Vzorcem z natančno izmerjenimi gostotami oblike I smo pomerili odziv pri obeh  $\nu_+^{14}N$  JKR (2587 ter 3439kHz). Vsak vzorec smo pomerili najmanj trikrat. V Origin 6 smo podatke prikazali na grafu. Naredili smo še linearno regresijo. Izračunani parametri skupaj s prilegajočo premico in intervalom napovedovanja ( $\alpha = 0.05$ ) so predstavljeni na slikah 29 in 30.

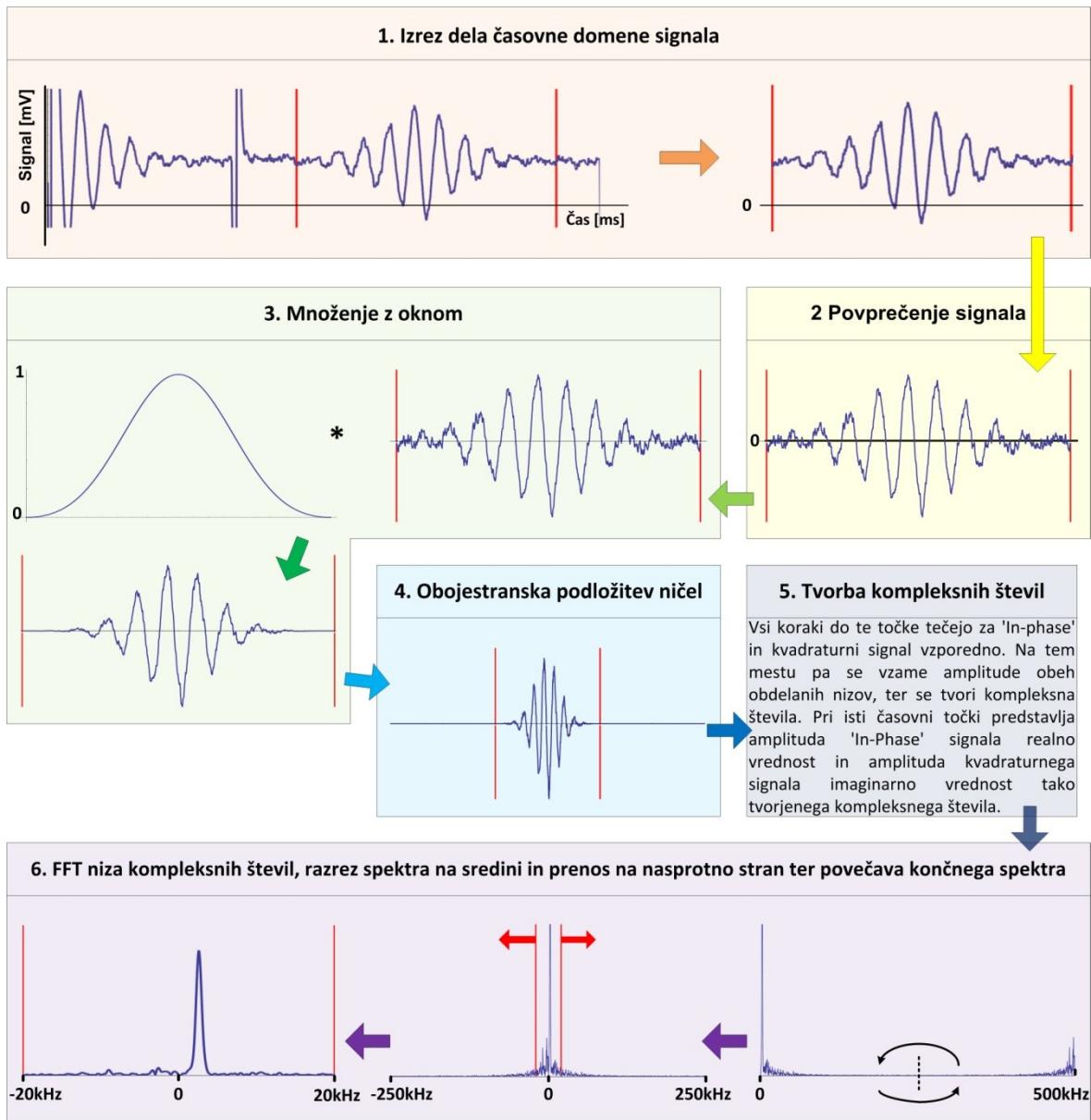
### ***Opazovanje prehoda steklastega nifedipina v obliko I pri $\nu_+^{14}N$ JKR 2587kHz***

Najprej smo opazovali hitrost nastajanja oblike I pri povišani temperaturi. Pripravljenemu vzorcu steklastega nifedipina smo pomerili odziv. Na termostatirani grelec (RCT-Basic, IKA ) smo postavili oljno kopel in nastavili ustrezeno temperaturo ter hitrost magnetnega mešala (280Hz). Spodnji del vsebnika 2 z vzorcem smo potopili v oljno kopel, tako da je bil nivo nifedipina v vzorcu pod nivojem oljne kopeli. Vzorec smo nato segrevali določen čas. Zatem smo ga hitro ohladili v hladni tekoči vodi na sobno temperaturo. Ponovno smo pomerili odziv. Proceduro smo nato ponavljali, dokler ni bil dosežen plato pretvorbe, pri čemer smo kot plato smatrali končno območje, kjer se je hitrost nadaljne kristalizacije izredno upočasnila oz. praktično ustavila. Na spektrih smo na koncu izmerili višino vrhov, ki smo jih nanesli na grafe odvisnosti signala od časa segrevanja. Temperature pri posamezni seriji segrevanj so obsegale 65, 70, 75 ter 80°C.

Nad 80°C smo opazovali dosežene platoje prehoda v odvisnosti od temperature. Namesto časa segrevanja, smo tukaj spreminjali temperaturo. Vzorec smo segreli na temperature od 65-165°C. Pri vsaki temperaturi smo segrevali dovolj dolgo, da je bil plato dosežen (oz. da je hitra eksponentna faza že potekla). Vzorec smo nato ohladili v mrzli tekoči vodi na

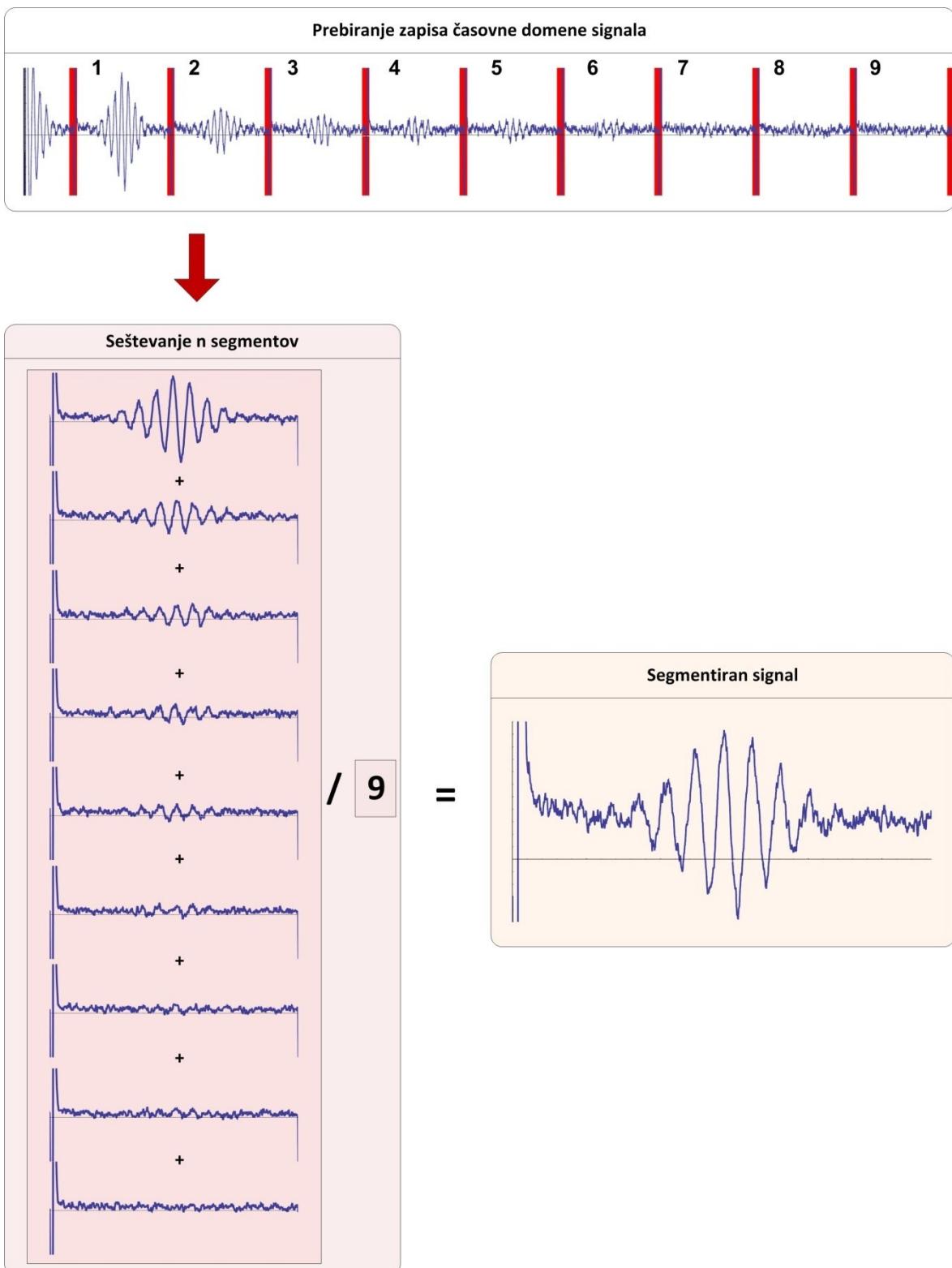
sobno temperaturo ter pomerili odziv. Čase segrevanja za 65, 70, 75 ter 80°C smo ocenili iz opazovanj odvisnosti hitrosti nastajanja oblike I od časa gretja. Plato kristalizacije je nad 80°C dosežen v nekaj minutah (71). Pri 90°C smo segrevali 55min, na vseh ostalih višjih temperaturah (110, 125, 135, 145, 155, 160 ter 165°C) pa 30min. Na koncu smo na spektrih izmerili višino vrhov. Te podatke smo potem prikazali na grafu odvisnosti odziva od temperature segrevanja.

## Obdelava podatkov NQR sistem 1



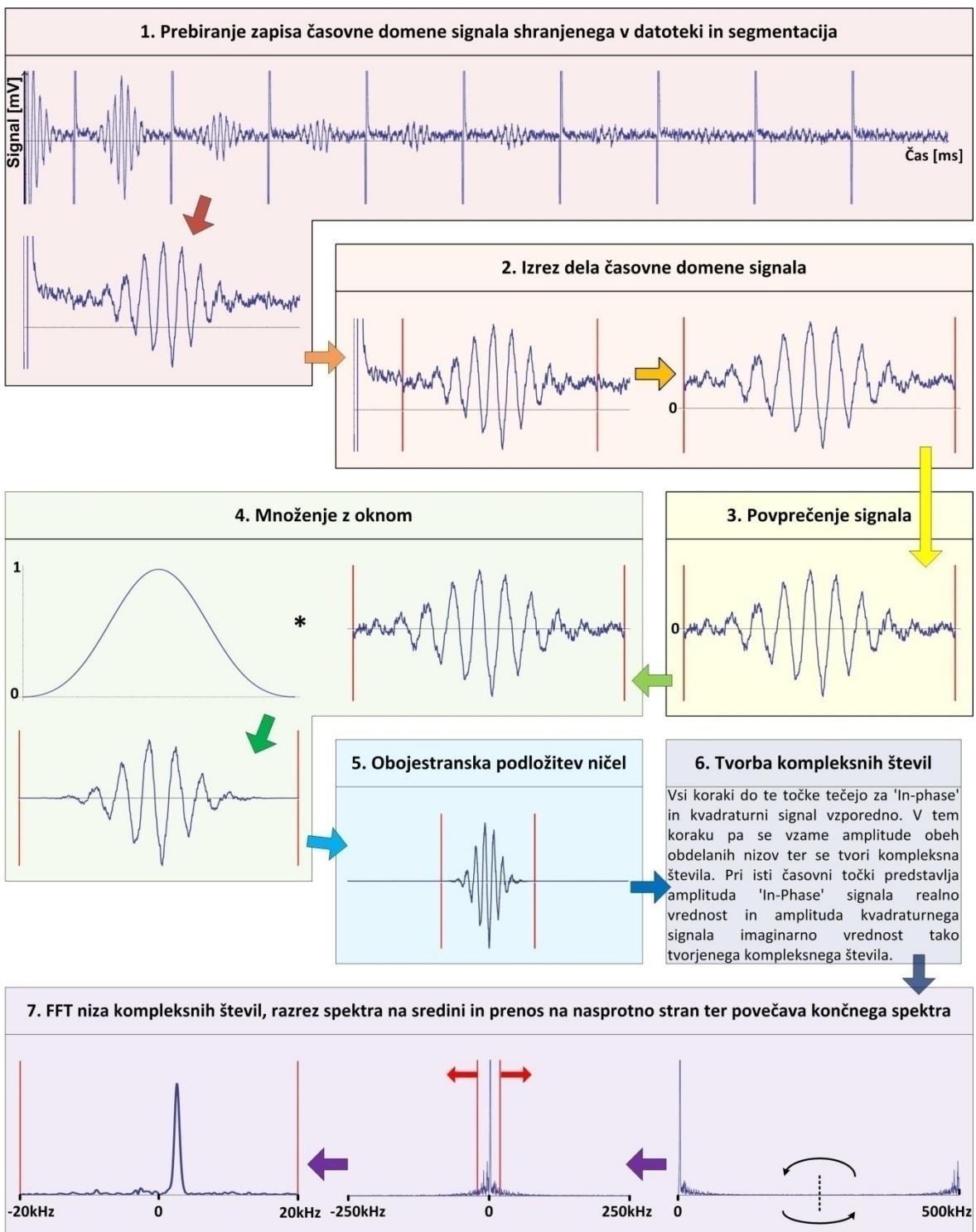
Slika 15. Shema obdelave podatkov pri NQR sistemu 1.

## Segmentacija



Slika 16. Na shemi je prikazana segmentacija časovnega zapisa NQR sistema 2.

## Obdelava podatkov NQR sistem 2



Slika 17. Shema obdelave podatkov NQR sistema 2. V prvem koraku poteče segmentacija, kjer se sezijejo in povprečijo segmenti sekvence. Najpogosteje je pri kvadrupolni resonanci to CPMG sekvenca.

### **Blackmanovo okno**

Enačba s katero smo tvorili zvonasto okno (množenje z oknom na slikah 14 in 16) (84).

$$w(n) = 0,42 - 0,5 \cos\left(2\pi \frac{n}{N}\right) + 0,08 \cos\left(4\pi \frac{n}{N}\right), \quad 0 \leq n \leq N \quad /15/$$

n je enako številu točk v zapisu, ki ga množimo z oknom. V našem primeru je bil n enak številu točk v izrezu.

### **Linearna regresija**

Linearno regresijo smo opravili v Originu 6. Izračunali smo R (korelacijski koeficient),  $R^2$  (koeficient določenosti), interval napovedovanja ( $\alpha = 0.05$ ) ter parametre premice, ki so navedeni na svojih ustreznih slikah.

$$y = a + bx \quad /16/$$

### **Boltzmannova sigmoidna krivulja**

Trdno-trdno pretvorbe večinoma potekajo v obliki sigmoidnih krivulj. V Originu 6 smo za prileganje izbrali Boltzmannovo sigmoidno krivuljo. Njena enačba je:

$$y = \frac{A_1 - A_2}{1 + e^{(t-t_0)/dt}} + A_2 \quad /17/$$

Njeni parametri v našem primeru pomenijo:

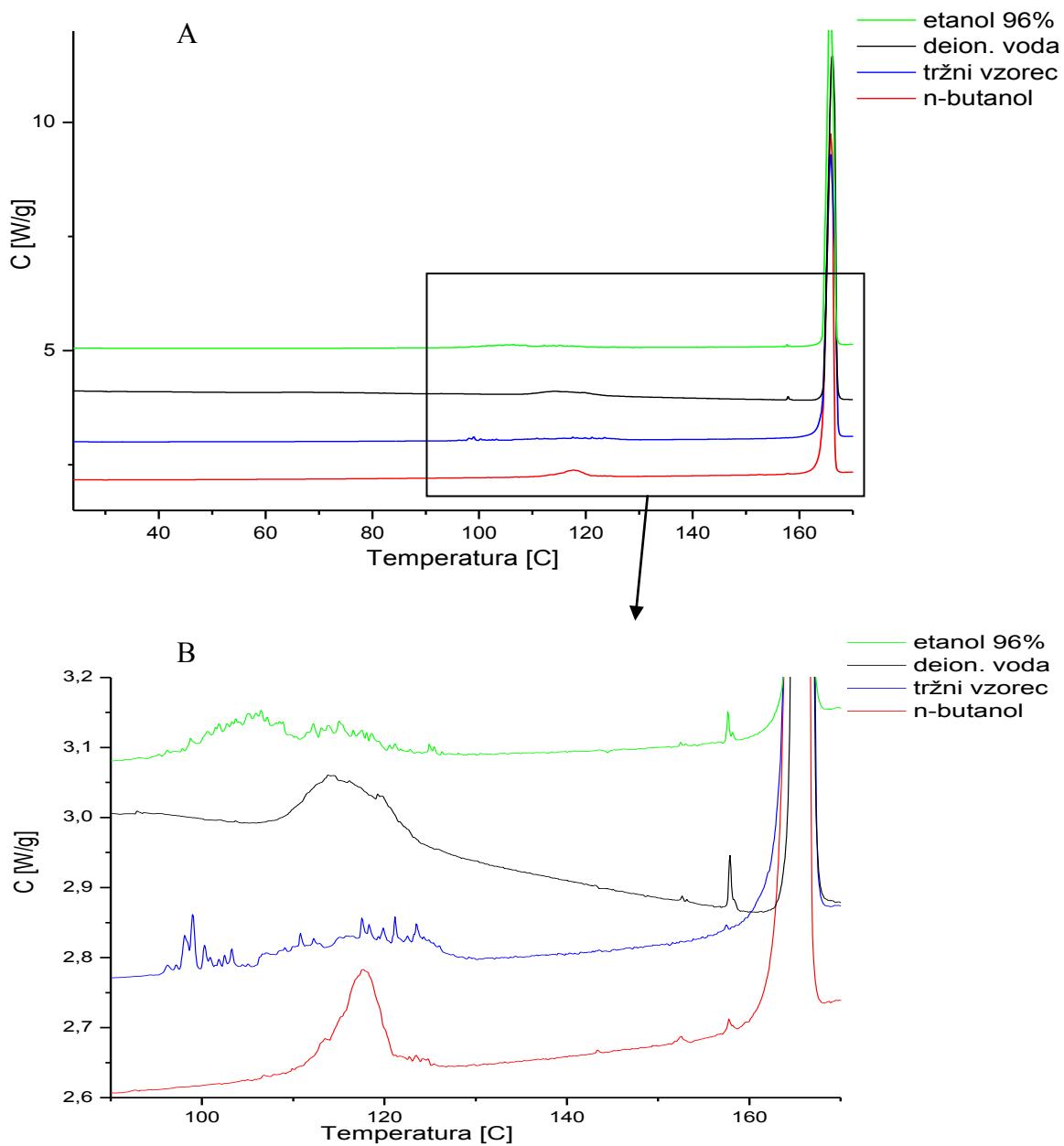
- t je čas od začetka meritve
- $t_0$  je čas, ki ponazarja 50% prehod v kristalno obliko
- dt je hitrost naraščanja
- $A_1$  je število, ki ponazarja začetno vrednost signala in je enak šumu ob  $t=0$
- $A_2$  je število, kateremu se funkcija približuje ko gre  $t \rightarrow \infty$

Vsek graf, ki vsebuje prilegajočo Boltzmannovo krivuljo ima tabelo z zgoraj navedenimi parametri vključno s koeficientom določenosti  $R^2$ .

## 6 REZULTATI IN RAZPRAVA

### 6.1 SULFANILAMID

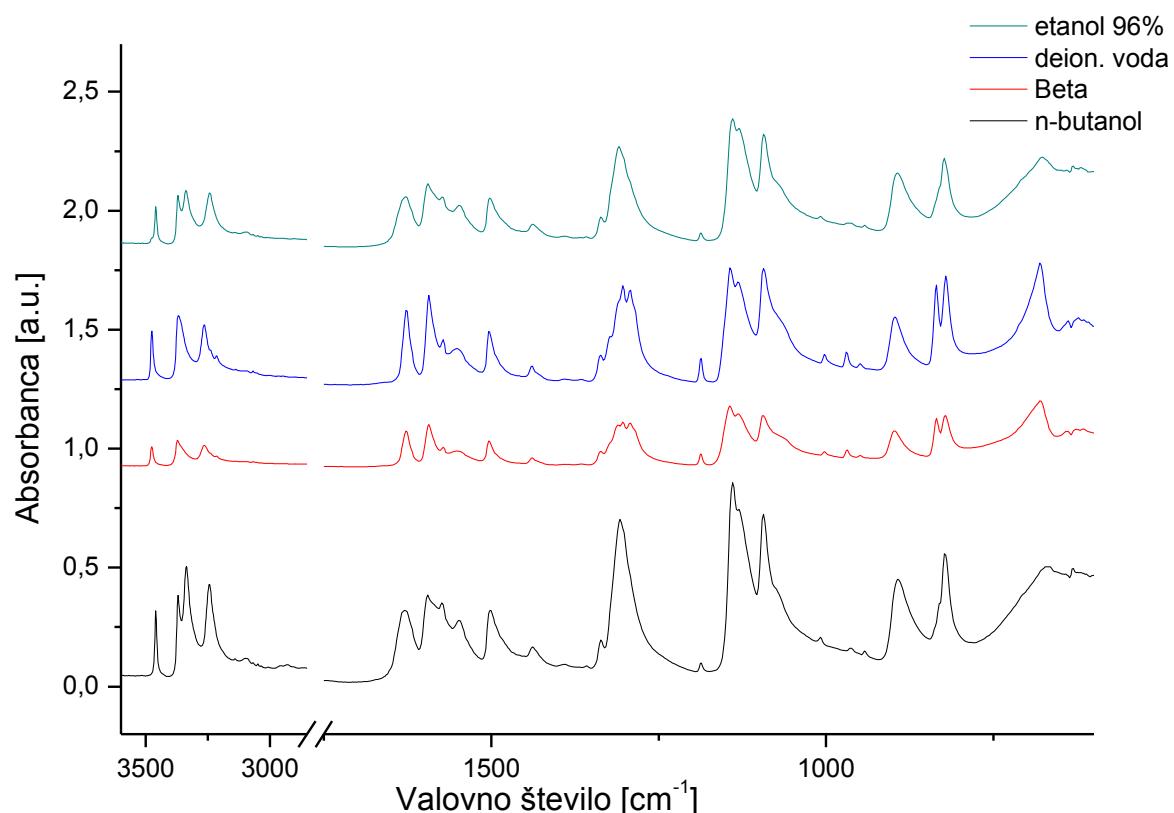
#### 6.1.1 DSC



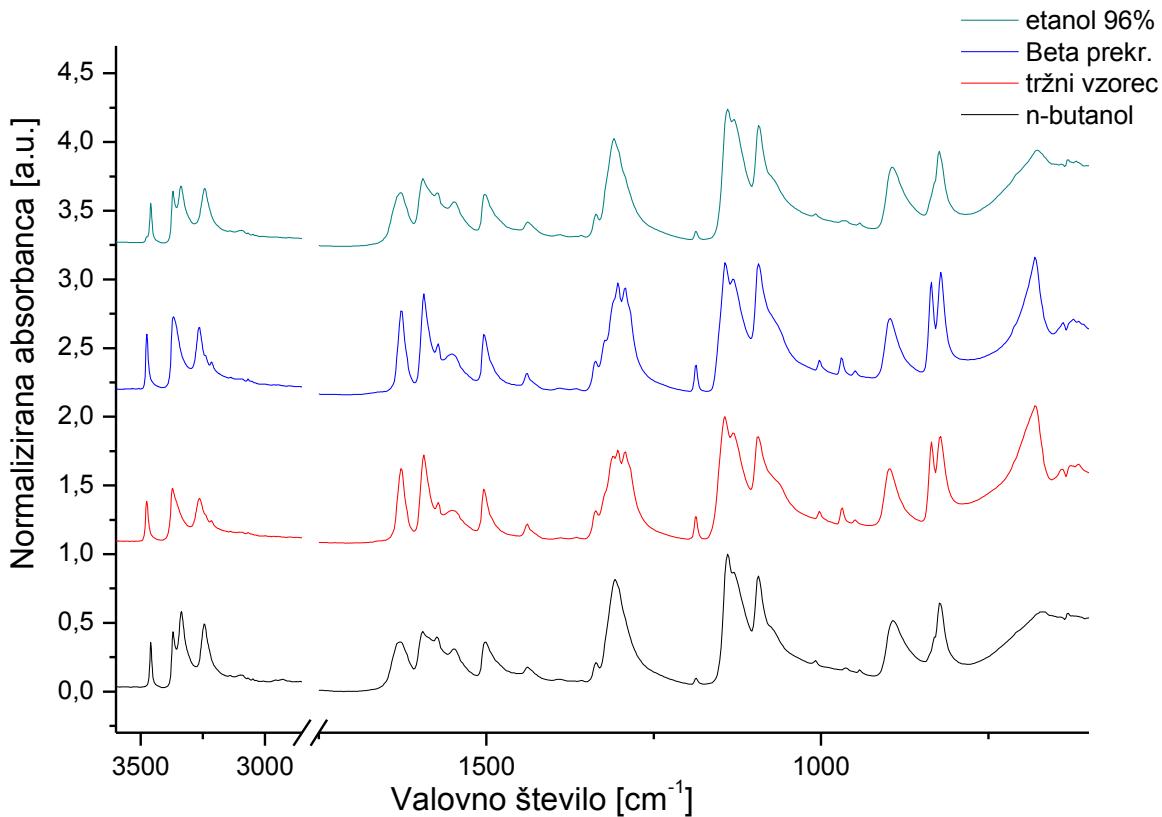
Slika 18. DSC posnetek vzorcev sulfanilamida, pripravljenih s prekrstalizacijo v ustreznih topilih. Hitrost segrevanja je bila 5K/min.

Vzorci sulfanilamida, ki smo jih prekristalizirali iz različnih topil, so pokazali različne DSC termograme (slika 18). Vsi so vsebovali v bližini tališča najstabilnejše oblike ( $163\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) še dodatne male vrhove, ki so ustrezali tališčem polimorfov alfa in beta ( $152$  in  $156\text{ }^{\circ}\text{C}$ ). Pri alfa in gama polimorfu pride v temperaturnem območju  $90$ - $120\text{ }^{\circ}\text{C}$  do prehoda v gama obliko, ki je pri višjih temperaturah in atmosferskem tlaku termodinamično stabilna oblika (52-54). Vzorec, prekristaliziran iz n-butanola je dal vrh pri  $117\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Dobavljeni vzorec sulfanilamida kaže širok vrh pretvorbe v gama obliko v intervalu  $95$ - $125\text{ }^{\circ}\text{C}$ , kar je najbrž posledica tega, da je vzorec sestavljen iz faze beta ter manjšega prispevka alfa faze, ki ima vrh okoli  $95$ - $100\text{ }^{\circ}\text{C}$  (52). Pri obliki dobljeni s prekristalizacijo v vodi, smo posneli širši vrh na intervalu  $110$ - $120\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Le-ta je verjetno sestavljen iz dveh prispevkov pri  $113$  in  $117\text{ }^{\circ}\text{C}$ , s prevladujočim vrhom pri nižji temperaturi. Posnetek vzorca, prekristaliziranega iz  $96\%$  etanola, vsebuje dva vrha, enega pri  $100$ - $105\text{ }^{\circ}\text{C}$  in drugega pri  $113\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

### 6.1.2 IR



Slika 19. FT-IR spekter, posnet na kristalnih vzorcih sulfanilamida med  $4000$ - $600\text{cm}^{-1}$ . Odseki nad  $3600\text{cm}^{-1}$  ter med  $2850$ - $1750\text{cm}^{-1}$  ne vsebujejo vrhov, zato na grafu niso prikazani.



Slika 20. Normaliziran FT-IR spekter kristalnih vzorcev sulfanilamida. Normalizacijo smo naredili, da smo laže primerjali kvalitativne razlike med vzorci.

Na IR spektrih so si bili vzorci zelo podobni, kljub temu pa je prišlo pri njih do majhnih odstopanj (slika 20). V primerjavi z dobavljenoučinkovine sta vzorca pridobljena iz etanola ter n-butanola pokazala različno razcepljenost pri večih vrhovih. Spekter vzorca, pripravljen s prekristalizacijo iz vode, pa je bil identičen dobavljeni obliki. Sklepamo lahko, da je bil vzorec z dobavljenoučinkovino torej res beta oblika sulfanilamida.

Ob upoštevanju DSC lahko dodatno zaključimo, da je bil tržni vzorec beta oblika sulfanilamida z nekaj alfa fazo. Vzorec prekristaliziran iz etanola bi lahko opisali kot mešanico alfa in beta oblike z večjim deležem prve. Za vzorec pripravljen iz n-butanola lahko iz DSC termogramov ter IR spektrov razberemo le, da se je zagotovo razlikoval od dobavljenega beta oblike.

### 6.1.3 $^{14}\text{N}$ JKR

Podatke o  $^{14}\text{N}$  kvadrupolnih resonančnih frekvencah dveh oblik sulfanilamida smo našli v literaturi, kjer pa ni bilo navedeno, za katera dva polimorfa gre (57). Podatke za eno obliko smo lahko pripisali beti, ki smo jo v laboratoriju zaradi močnega odziva pogosto uporabili za testiranje NQR sistemov (preglednica VII). Neznana oblika je imela dve  $\nu_+$   $^{14}\text{N}$  kvadrupolni resonančni frekvenci pri 2705 ter 2905kHz.

Preglednica VII. Znane resonance  $^{14}\text{N}$  JKR sulfanilamida beta

Dušikov atom	$\nu_+$ [kHz]	$\nu_-$ [kHz]	$\nu_0$ [kHz]
1	3424	2494	930
2	3072	2563	512

Preliminarno testiranje z dvojno resonanco je dalo le zelo široka frekvenčna območja z verjetnimi  $^{14}\text{N}$  kvadrupolnimi resonančnimi frekvencami (preglednica VIII). Relaksacija vodikovih jeder v vzorcih, prekristaliziranih iz etanola ter butanola, je bila zelo hitra (kratek  $T_1$ ), kar je povzročalo težave pri opazovanju njihovega sklapljanja z dušikovimi jedri. Vzorce je bilo potrebno ohladiti na -70°C, da se je relaksacija tako upočasnila, da je bil test z dvojno resonanco lahko izveden.

Preglednica VIII. Rezultati opazovanja prekristaliziranih vzorcev sulfanilamida z metodo dvojne resonance pri -70°C.

Vzorec	Območja možnih frekvenc [kHz]		
n-butanol	2450-2500	2850-2900	
etanol	2450-2520	2550-2650	2700-2850

#### 6.1.3.1 ISKANJE $^{14}\text{N}$ KVADRUPOLNIH RESONANC SULFANILAMIDA PREKRISTALIZIRANEGA IZ N-BUTANOLA

Začeli smo z iskanjem resonanc vzorca dobljenega s prekristalizacijo iz n-butanola. Uporabili smo NQR sistem 1. Z različnimi nastavtvami smo preiskali območja okoli 2470 ter 2870. Na teh dveh območjih kljub intenzivnemu iskanju nismo našli kvadrupolnih resonanc. Poleg tega smo tudi naredili meritve pri 2563 ter 3424kHz, kjer ima kvadrupolne resonance beta oblika. Tudi tukaj odziva, ki bi presegal šum, ni bilo.

V naslednjih meritvah so prikazani rezultati merjenja odziva vseh treh vzorcev pri  $^{14}\text{N}$  kvadrupolnih resonančnih frekvencah beta oblike sulfanilamida.

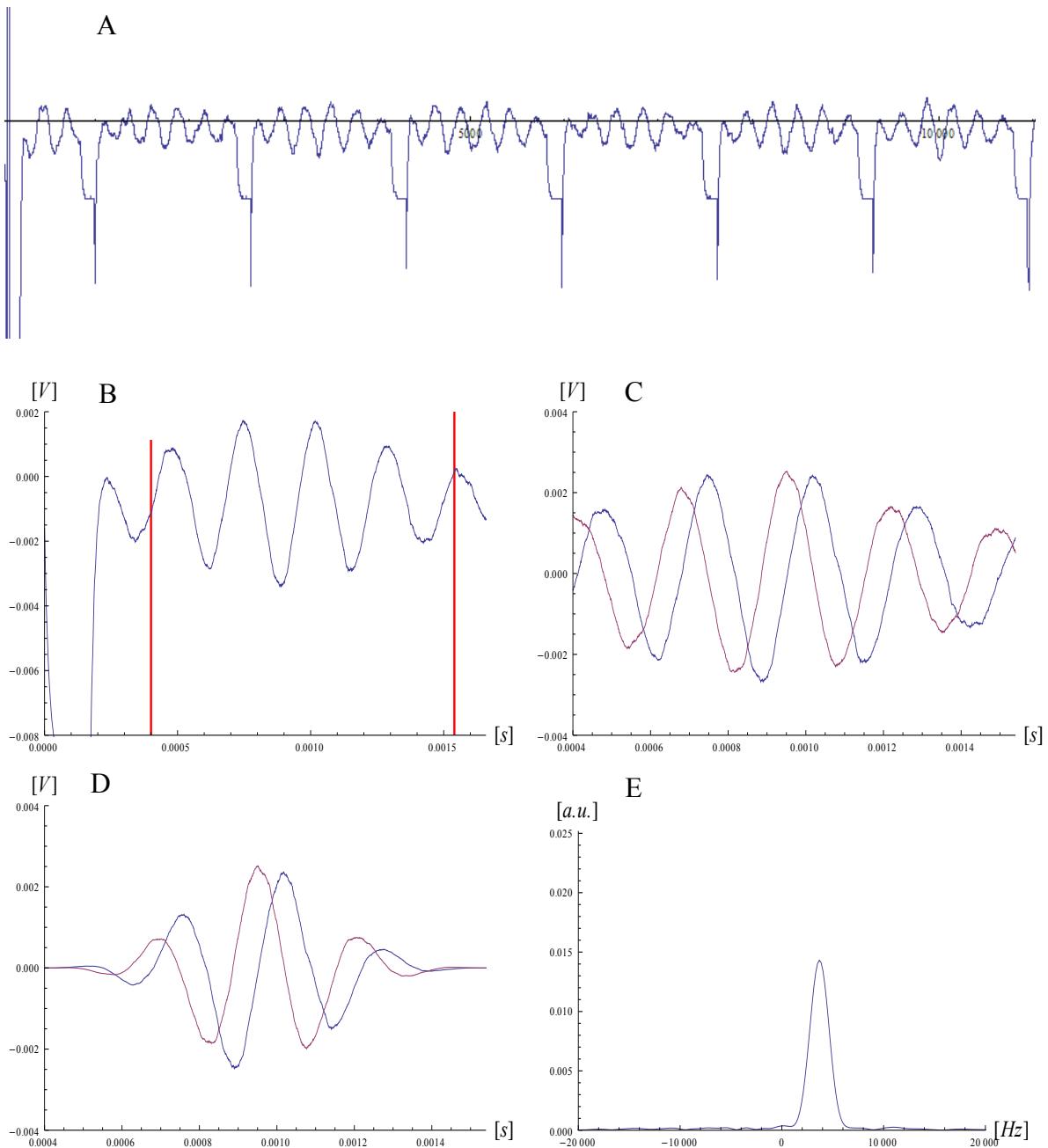
#### 6.1.3.2 SULFANILAMID BETA PRI 3072kHz

Beta oblika sulfanilamida ima izredno močan odziv pri frekvencah  $^{14}\text{N}$  kvadrupolnih resonanc. Optimizirani podatki za zajemanje s sistemom 2 pri 3072kHz so navedeni v tabeli spodaj (preglednica IX).

*Preglednica IX. Nastavitev parametri NQR sistema 2 za spremeljanje  $^{14}\text{N}$  JKR signala sulfanilamida beta.*

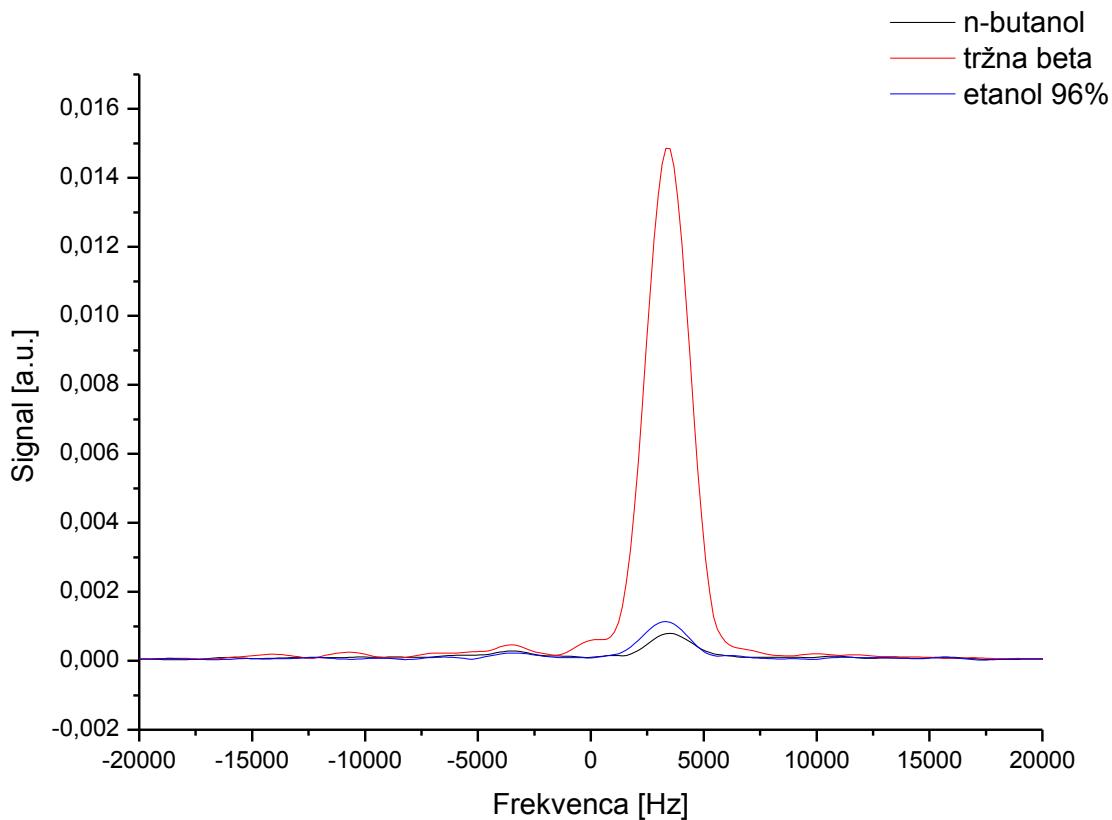
Nastavitev NQR sistema 2			
Nastavitev vzbujevalno detekcijskega dela			
Referenčna frekvanca	3069kHz	Čas ponavljanja meritev	0,53s
Število ponovitev	1000	Trajanje celotnega zajemanja	9min
Dolžina $\pi/2$ pulza	0,03ms	Dolžina $\pi$ pulza	0,06ms
Dolžina $\tau$	0,83ms	Hitrost vzorčenja A/D zajemalnika signala	0,001ms
Število $\pi$ pulzov	12	Temperatura	sobna (22-24C)
Parametri obdelave podatkov			
Število uporabljenih segmentov	12	Izrez med točkama	$x_1=0,4\text{ms}$ $x_2=1,54\text{ms}$
Uporabljeno okno	blackman	Faktor števila ničel	4
Lastnosti zapisa in obdelave podatkov			
Dolžina zapisa časovne domene	0,02075s		
Število vseh točk	20750	Število točk v segmentu	1660
Število točk v izrezu	1141	Število točk po podložitvi ničel	5705
Spektralna resolucija	175Hz		

Značilen posnetek sulfanilamida beta s sistemom 2 pri 3072kHz je prikazan na naslednji strani (slika 21).



*Slika 21. Prikazan je značilen zapis merjenja  $^{14}\text{N}$  kvadrupolnih jedrskih resonanc vzorca sulfanilamida beta pri 3072 kHz z NQR sistemom 2 (referenčna frekvenca pri 3069 kHz). Graf A prikazuje končni zapis časovne domene s  $\pi/2$  pulzom in petimi  $\pi$  pulzi. Ta se nato segmentira in dobimo lep izpovprečen segment prikazan na B. Izrez (C), podložitev ničel (D) ter končna FFT, ki da lep spekter (E) z zelo ugodnim razmerjem S/N.*

Z enakimi nastavivami smo posneli tudi spektra ostalih dveh vzorcev. Primerjava spektrov je prikazana na sliki 22.



*Slika 22. Primerjava meritev odziva  $^{14}N$  kvadrupolne jedrske resonance vzorcev pri 3072kHz (resonančna frekvenca sulfanilamida beta) z NQR sistemom 2 (referenčna frekvenca pri 3069kHz).*

Beta oblika je imela daleč največji odziv, medtem ko sta imela preostala vzorca le majhne izmerjene odzive (slika 22). To je z veliko gotovostjo potrdilo razlike med dobavljenim sulfanilamidom ter obema prekristaliziranimi vzorcema.

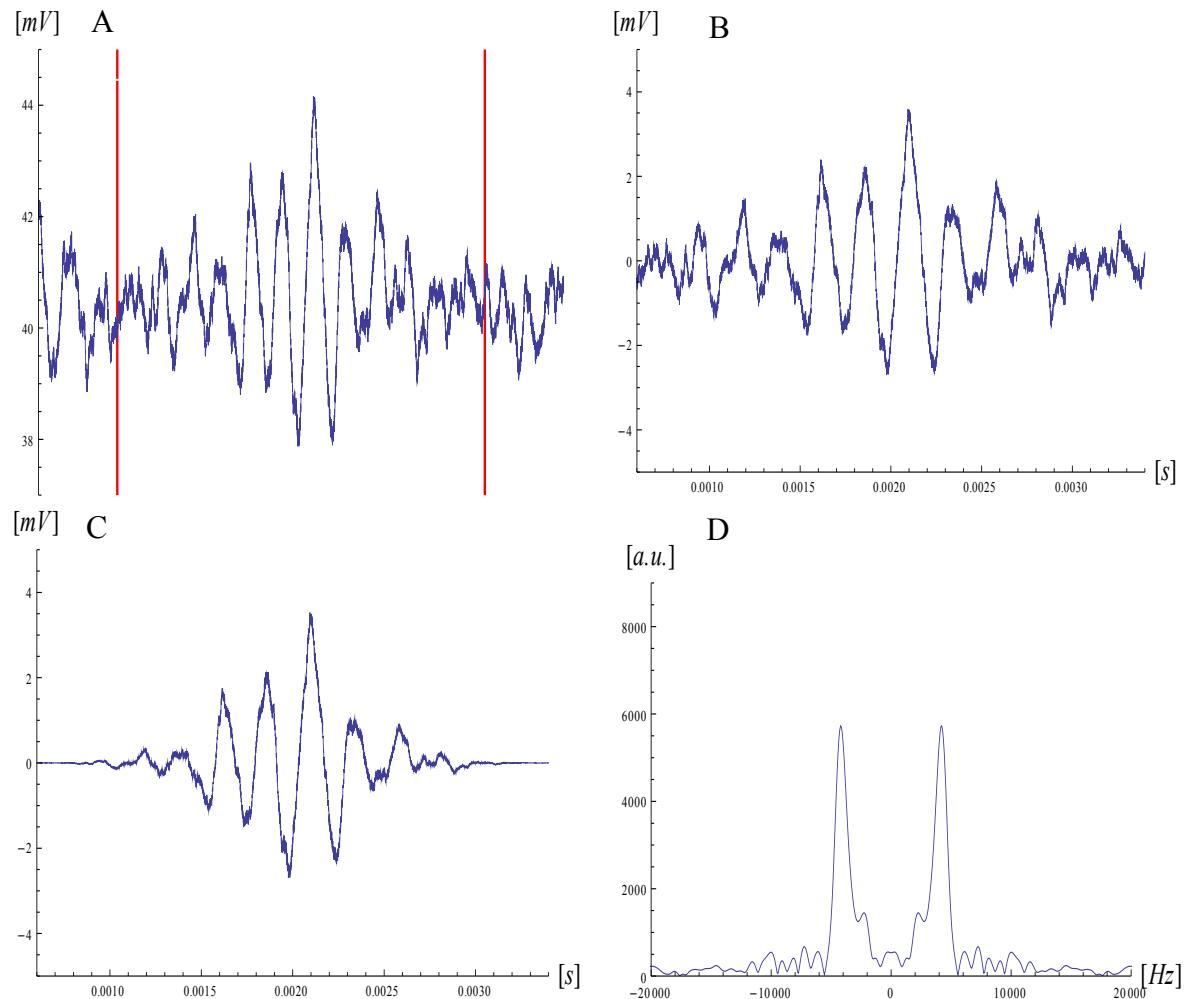
### 6.1.3.3 SULFANILAMID BETA PRI 3424kHz

Odziv pri višji frekvenci smo opazovali s sistemom 1. Optimizirani nastavitevni parametri za ta sistem so navedeni v spodnji tabeli (preglednica X).

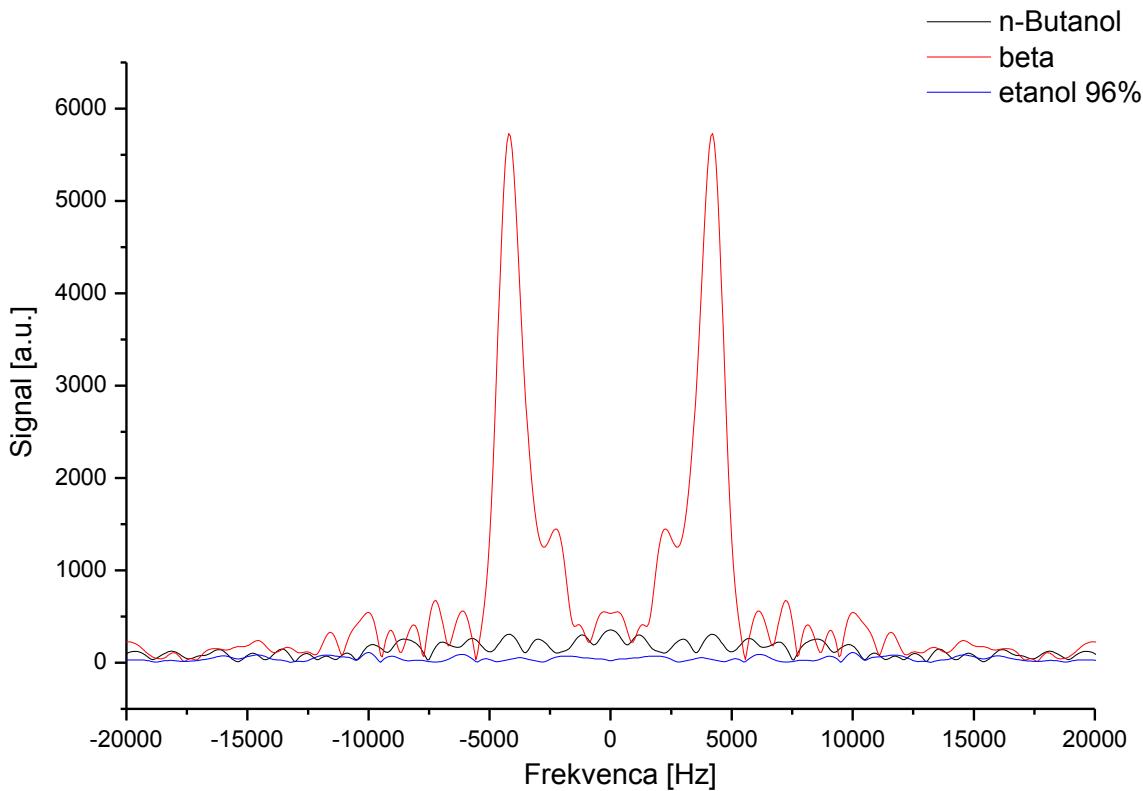
*Preglednica X. Nastavitevni parametri NQR sistema 1 za spremeljanje  $^{14}N$  JKR signala sulfanilamida beta. Ta sistem ima možnost generiranja le enega  $\pi$  pulza, zato v tem primeru segmentacija zapisa ni možna.*

Nastavitev NQR sistema 1			
Nastavitev vzbujevalno detekcijskega dela			
Referenčna frekvencia	3420kHz	Čas ponavljanja meritev	0,5s
Število ponovitev	2048	Trajanje celotnega zajemanja	17min
Dolžina $\pi/2$ pulza	0,05ms	Dolžina $\pi$ pulza	0,1ms
Dolžina $\tau$	2,3ms	Hitrost vzorčenja A/D zajemalnika signala	0,0004ms
Število $\pi$ pulzov	1 (le eden možen)	Temperatura	sobna (22-24C)
Parametri obdelave podatkov			
Število uporabljenih segmentov	/	Izrez med točkama	x1=0,6ms x2=1,54ms
Uporabljeno okno	blackman	Faktor števila ničel	4
Lastnosti zapisa in obdelave podatkov			
Dolžina zapisa časovne domene	0,04s		
Število vseh točk	10000	Število točk v segmentu	/
Število točk v izrezu	7001	Število točk po podložitvi ničel	35005
Spektralna resolucija	71Hz		

Ta sistem nima segmentacije, kar se na naslednjem sklopu meritev jasno vidi. Značilen posnetek sulfanilamida beta pri 3424kHz s sistemom 1 je prikazan na naslednji strani (slika 23).



Slika 23. Prikazan je značilen zapis enokanalnega merjenja  $^{14}\text{N}$  kvadrupolnih jedrskih resonanc vzorca sulfanilamida beta pri  $3424\text{kHz}$  z NQR sistemom 1 (referenčna frekvenca pri  $3420\text{kHz}$ ). Celoten zapis je prikazan na grafu A. To obsega časovno okno  $4\text{ms}$  po  $\pi$  pulzu, kar ustreza prvemu segmentu NQR sistema 2. V primerjavi z dvokanalnim načinom merjenja RF odziva (slika 21 zgoraj), tukaj manjka en kanal, zato je na slikah B in C izrisana le ena časovna odvisnost signala. V spektru pa se manjko enega kanala kaže v dveh vrhovih namesto enega. To izvira iz lastnosti diskretnje Fourierjeve transformacije, ki za določitev pravilnega položaja vrha v spektru potrebuje dva kanala. V primeru, da je na voljo le en kanal, se vrh izriše na obeh straneh središča spektra.



*Slika 24. Primerjava meritev odziva  $^{14}\text{N}$  JKR vzorcev pri 3424kHz z NQR sistemom 1 (referenčna frekvenca pri 3420kHz). Ponovno se vidi močan vrh beta oblike, medtem ko pri ostalih dveh vzorcih ni videti vrhov, ki bi izstopali iz šuma. Vidi se močno poslabšanje razmerja S/N v primerjavi z dvokanalnim NQR sistemom 2.*

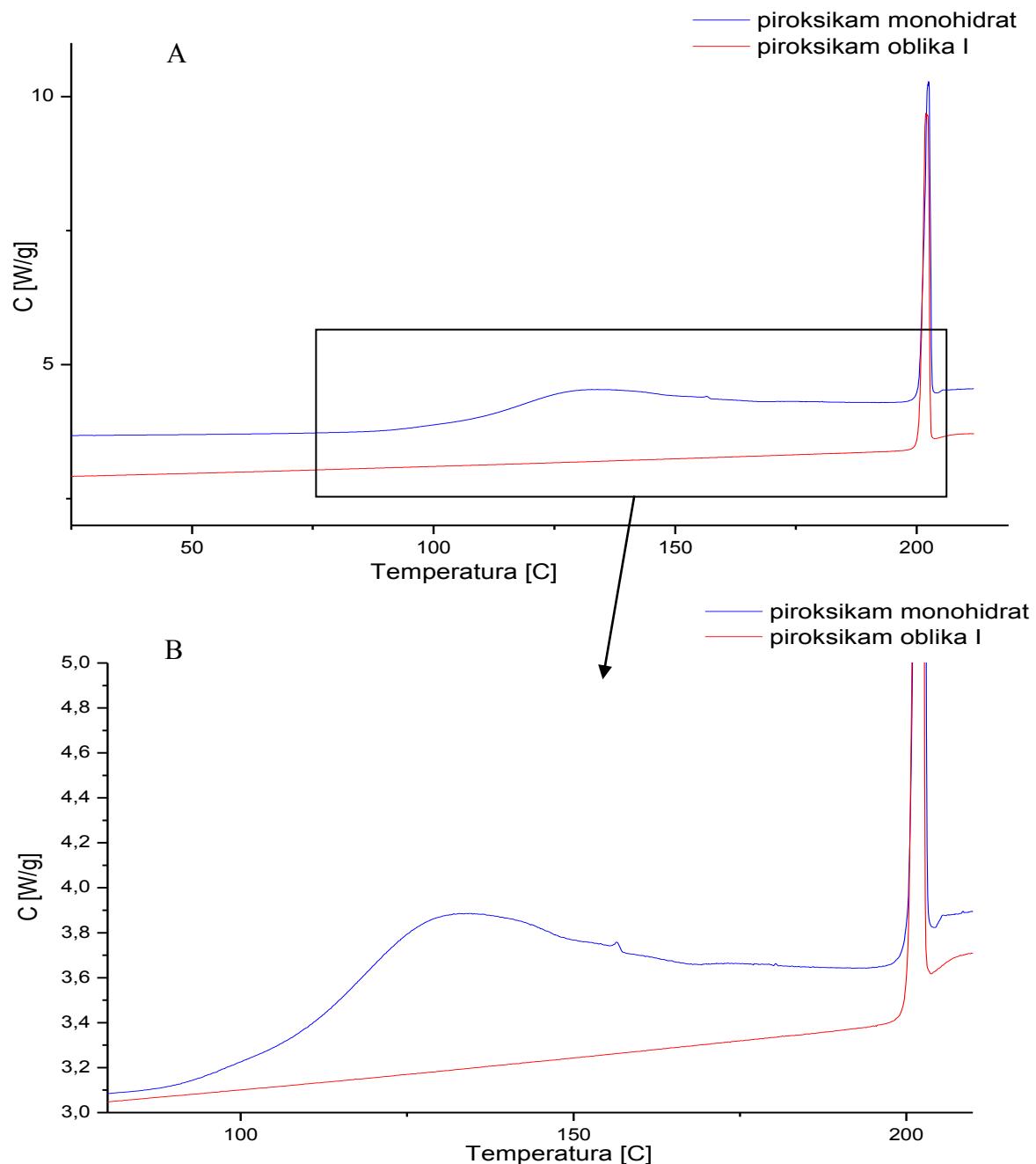
Rezultati merjenja  $\nu_+$   $^{14}\text{N}$  kvadrupolnih odzivov so potrdili ugotovitve DSC termogramov ter FT-IR spektrov. Prekristalizirana vzorca sta se zagotovo razlikovala od dobavljenega sulfanilamida. Pri tem je na spektru pri 3072kHz možno opaziti pri obeh prekristaliziranih oblikah manjša vrhova na istem mestu kot je prisoten glavni vrh dobavljenega beta sulfanilamida. To nakazuje na nastanek manjše količine beta faze pri obeh prekristaliziranih vzorcih.

Zaradi veliko slabšega razmerja S/N teh dveh malih vrhov nismo opazili pri frekvenci 3420kHz, ki smo jo opazovali s sistemom 1 (slika 24). Prednost, ki jo ob ustreznih pogojih (relativno daljši  $T_2$ ) predstavlja sistem 2, je bila v teh meritvah dobro izražena.

Glede na rezultate lahko zaključimo, da je metoda  $^{14}\text{N}$  JKR zmožna razlikovati med znanimi polimorfi, pri čemer je potrebno poznati kvadrupolne resonančne frekvence vsaj ene oblike.

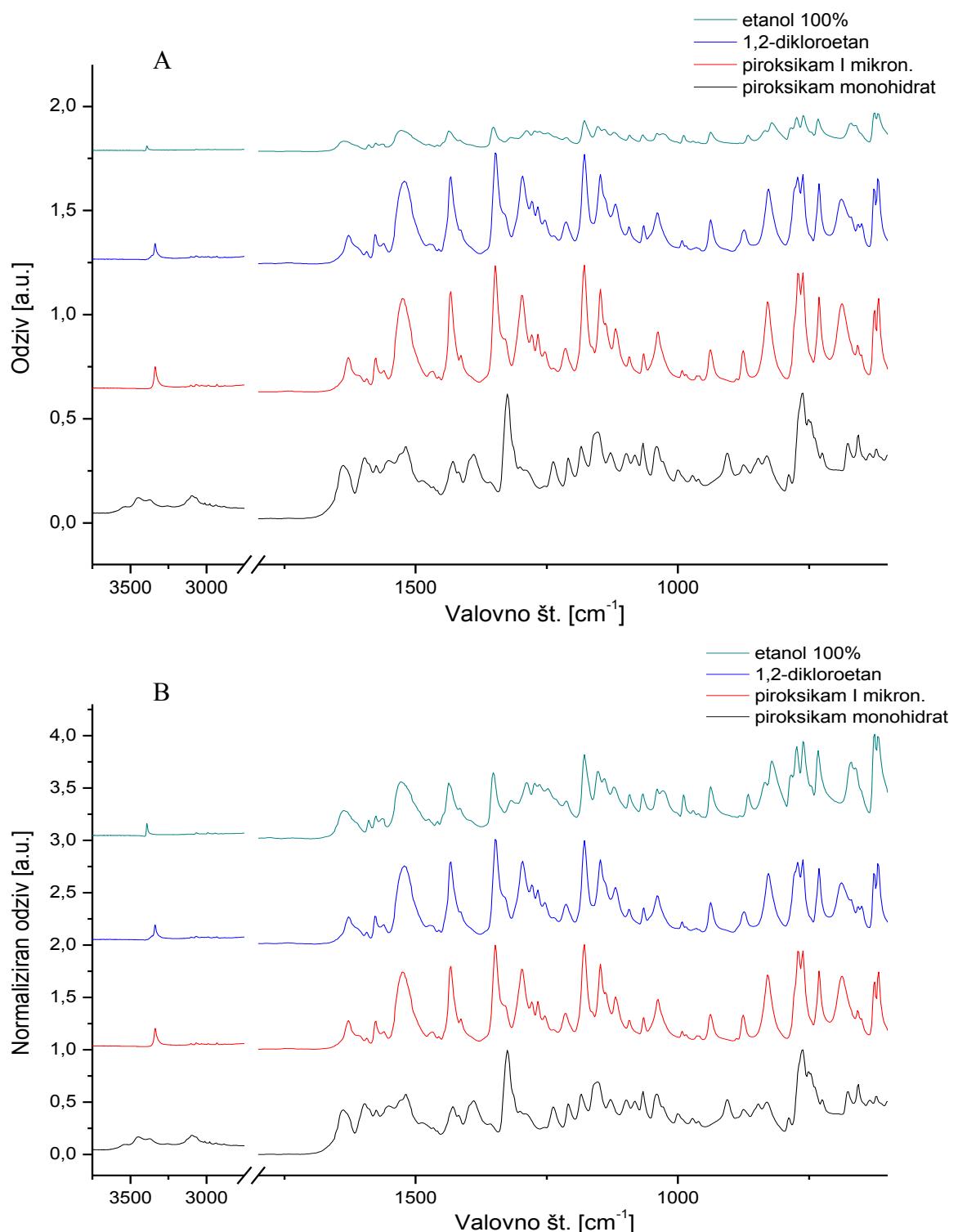
## 6.2 PIROSIKAM

### 6.2.1 DSC



Slika 25. DSC dobavljenega mikroniziranega piroksikama I ter piroksikam monohidrata. Hitrost segrevanja je bila 5K/min.

### 6.2.2 IR



Slika 26. FT-IR spekter, posnet na kristalnih vzorcih piroksikama med 4000-600cm<sup>-1</sup>. Deli nad 3750cm<sup>-1</sup>, ter med 2750-1800cm<sup>-1</sup> ne vsebujejo vrhov, zato na grafih niso prikazani. Graf B je normaliziran, tako da smo lahko lažje primerjali med spektri posameznih vzorcev.

Pri atmosferskem tlaku ter temperaturah vse do tališča je piroksikam I termodinamično najbolj stabilna oblika. Pri DSC analizi dobavljenega mikroniziranega vzorca piroksikama v temperaturnem območju  $20-T_{TAL}$  nismo našli pretvorb trdno-trdno (slika 25). Tališče je nastopilo pri  $202,4^{\circ}\text{C}$  z začetkom taljenja pri  $199^{\circ}\text{C}$ . To ustreza literurnim podatkom za tališče najstabilnejše oblike piroksikama (59). FT-IR spektra vzorca se je skladal z ustreznimi spektri piroksikama I najdenimi v literaturi (slika 26) (59). S tem smo potrdili domneve, da se dobavljeni tržni vzorec nahaja v termodinamično najstabilnejši obliki I.

Med  $100$  in  $160^{\circ}\text{C}$  z vrhom pri  $130^{\circ}\text{C}$  je pri monohidratu prisotna pretvorba, ki ponazarja izgubo molekule vode in prehod v brezvodno obliko (slika 25). Tališče tega vzorca nastopi pri  $202,4^{\circ}\text{C}$ . Poleg tega je bil tudil FT-IR spekter monohidrata identičen najdenim v literaturi (slika 26) (59). Istovetnost monohidrata je bila s tem potrjena.

Dodatno smo s FT-IR preverili še dva prekrstalizirana vzorca piroksikama, ki smo ju pripravili v laboratoriju glede na literurne podatke (59). Vzorec pripravljen s prekrstalizacijo iz 1,2-dikloroetana naj bi ustrezal obliki I, tisti pripravljen s prekrstalizacijo iz absolutnega etanola pa naj bi ustrezal metastabilni obliki II. FT-IR spektra prvega vzorca je bil identičen spektru dobavljenega piroksikama (slika 26) (59). Vzorec pripravljen iz 1,2-dikloroetana je vseboval piroksikam I. Spekter drugega vzorca, ki smo ga pripravili s prekrstalizacijo iz etanola, pa je bil identičen FT-IR spektru piroksikama II iz literature (slika 26) (59). V tem primeru smo dobili torej piroksikam II.

Vse štiri vzorce smo nato preverili še z  $^{14}\text{N}$  JKR.

### 6.2.3 $^{14}\text{N}$ JKR

V literaturi nismo našli nobenih podatkov o možnih  $^{14}\text{N}$  JKR frekvencah katerekoli oblike piroksikama. Preliminarna analiza z dvojno resonanco je bila narejena na obeh dobavljenih vzorcih piroksikama. Pri monohidratu zaradi prehitre relaksacije protonov (prekratek  $T_1$ ) ni bilo mogoče opraviti meritvev. Na drugi strani pa je metoda odkrila tri možna frekvenčna področja z domnevнимi resonancami  $^{14}\text{N}$  JKR piroksikama I (preglednica XI).

*Preglednica XI. Rezultati začetnih merjenj kupivnih vzorcev piroksikama z metodo dvojne resonance*

Vzorec	Območja možnih $\nu_+$ frekvenca [kHz]		
piroksikam I	2570-2610	2700-2800	3400-3500

Z iskanjem  $^{14}\text{N}$  JKR frekvenca piroksikama I smo začeli na sistemu 1 v območju 2570-2610kHz. Z nastavljivo frekvenco opazovanja na 2590kHz smo že s prvo meritvijo našli resonančno frekvenco pri 2587kHz. Dalje smo s sistemom 2 pregledali interval 2700-2820kHz, vendar resonančnih frekvenca oblike I tam nismo našli. Kot zadnje smo iskali v območju 3400-3500kHz. Odkrili smo še drugo resonančno frekvenco (preglednica XII). Vendar pa je bila spin-spinska relaksacija dušikovih jader v tem primeru tako hitra (kratek  $T_2$ ), da smo lahko videli le FID, ne pa odmeva.

*Preglednica XII. Odkrite  $^{14}\text{N}$  JKR frekvence piroksikama.*

Vzorec	Odkrite $\nu_+$ $^{14}\text{N}$ JKR frekvence [kHz]
piroksikam I	2587

Piroksikam monohidrat pri teh dveh frekvencah ne daje resonančnega odziva v spektru.

Nato smo optimizirali zajemanje odzivov piroksikama I na sistemu 2 s spremenjanjem različnih parametrov:

- čas ponavljanja meritvev,
- dolžino pulza  $\pi/2$ ,
- dolžino  $\tau$ ,
- število  $\pi$  pulzov v sekvenci.

Tako smo dobili nastavitev, ki smo jo uporabili pri vseh nadaljnjih meritvah piroksikama I (preglednica XIII).

Preglednica XIII. Optimizirane nastavitev NQR sistema 2 za opazovanje  $^{14}\text{N}$  JKR odziva piroksikama I.

## NASTAVITVE NQR SISTEMA 2

### OPAZOVANJE ODMEVOV pri 2587kHz

#### Nastavitev vzbujevalno detekcijskega dela

Referenčna frekvenca	2588kHz	Čas ponavljanja meritev	2s
Število ponovitev	1500	Trajanje celotnega zajemanja	50min
Dolžina $\pi/2$ pulza	0,02ms	Dolžina $\pi$ pulza	0,04ms
Dolžina $\tau$	0,72ms	Hitrost vzorčenja A/D zajemalnika signala	0,002ms
Število $\pi$ pulzov	10	Temperatura	sobna (22-24C)

#### Parametri obdelave podatkov

Število uporabljenih segmentov	10	Izrez med točkama	x1=0,4ms x2=1,4ms
Uporabljeno okno	blackman	Faktor števila ničel	4

#### Lastnosti zapisa in obdelave podatkov

Dolžina zapisa časovne domene	0,01512s		
Število vseh točk	7560	Število točk v segmentu	720
Število točk v izrezu	501	Število točk po podložitvi ničel	2505
Spektralna resolucija	200Hz		

### OPAZOVANJE FID pri 3439kHz

#### Nastavitev vzbujevalno detekcijskega dela

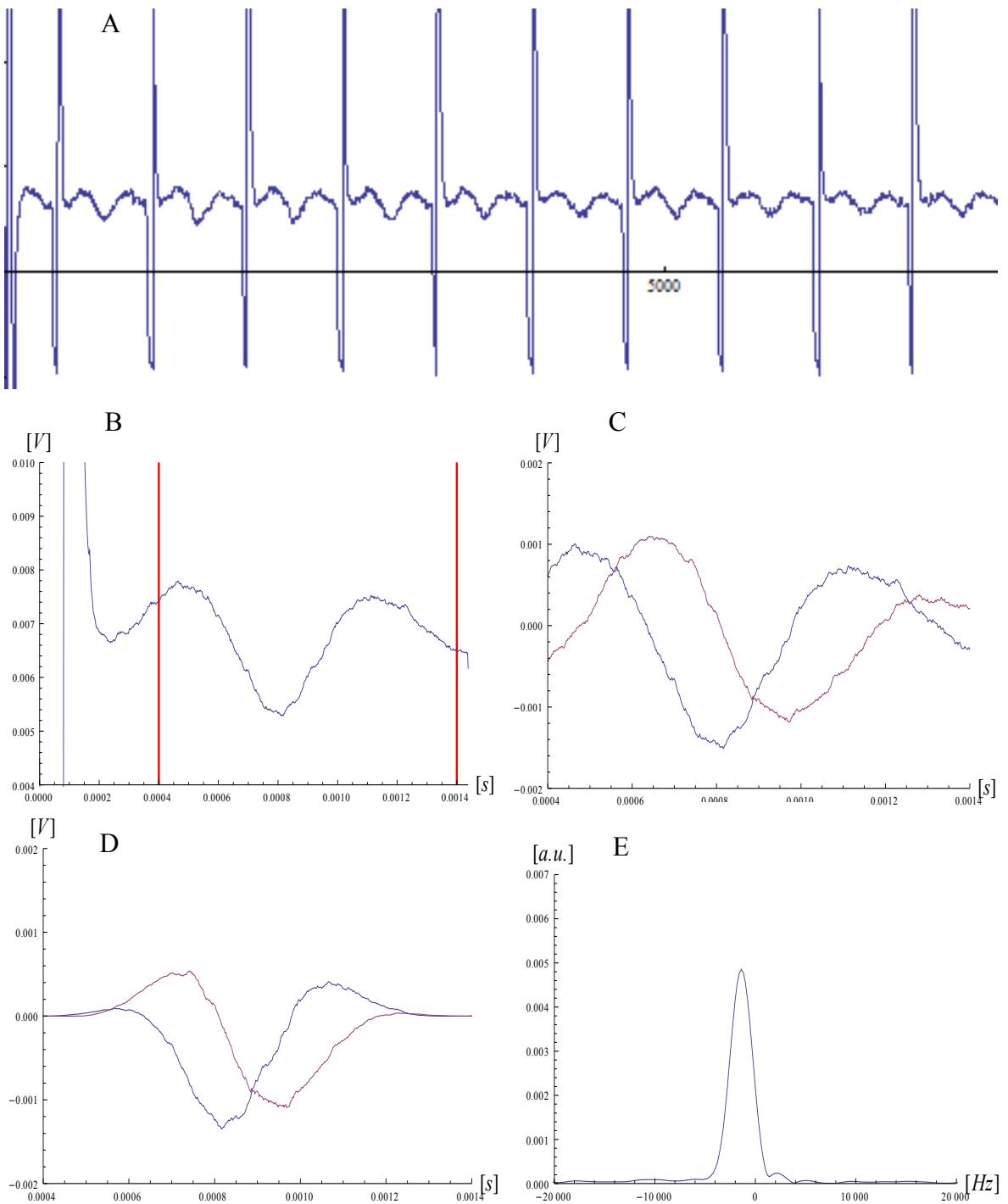
Referenčna frekvenca	3441,2kHz	Čas ponavljanja meritev	0,74s
Število ponovitev	1500	Trajanje celotnega zajemanja	37min
Dolžina $\pi/2$ pulza	0,008ms	Dolžina $\pi$ pulza	/
Dolžina $\tau$	3,008ms	Hitrost vzorčenja A/D zajemalnika signala	0,002ms
Število $\pi/2$ pulzov	5	Temperatura	sobna (22-24C)

#### Parametri obdelave podatkov

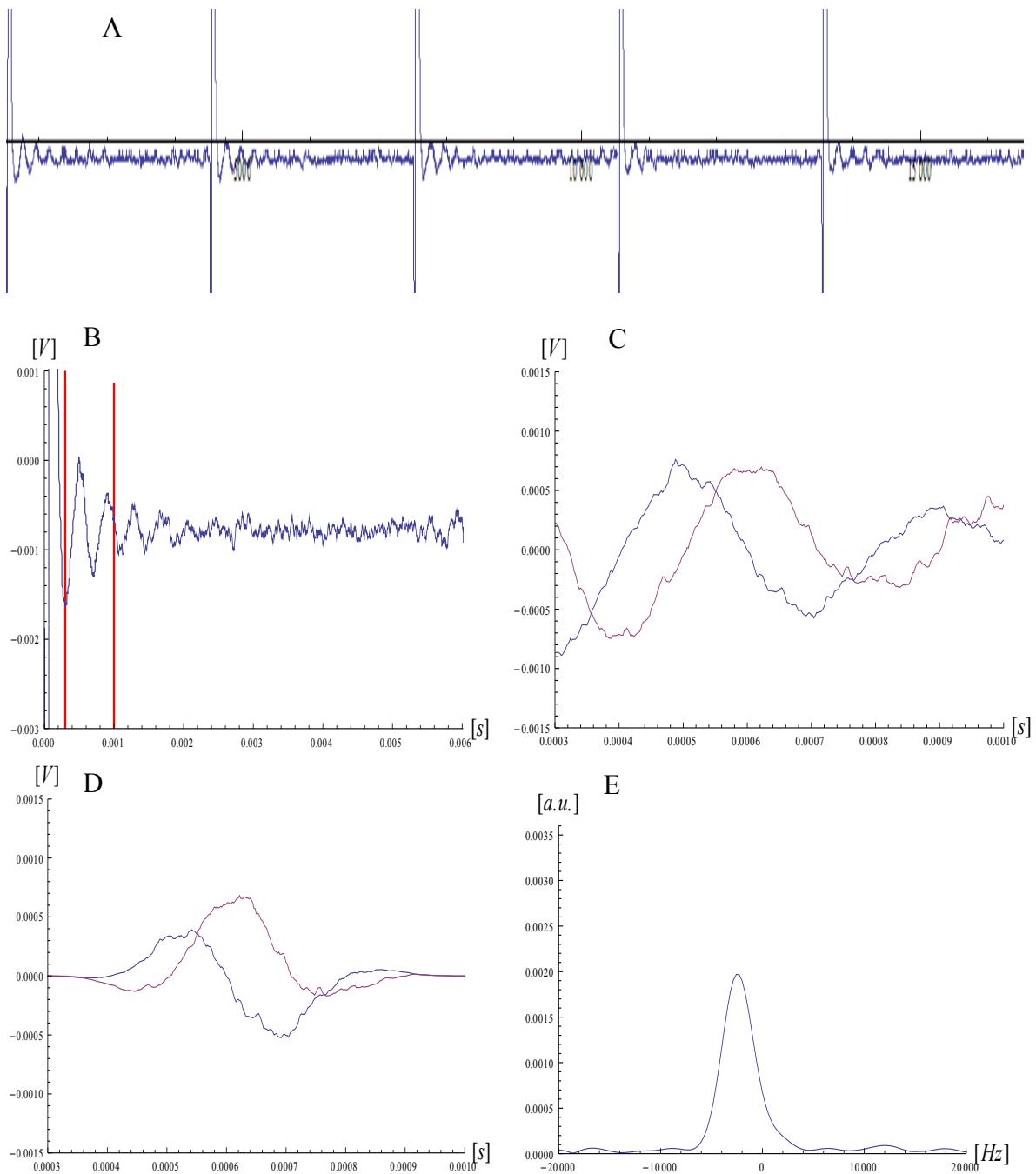
Število uporabljenih segmentov	5	Izrez med točkama	x1=0,3ms x2=1,0ms
Uporabljeno okno	blackman	Faktor števila ničel	4

#### Lastnosti zapisa in obdelave podatkov

Dolžina zapisa časovne domene	0,033088s		
Število vseh točk	16544	Število točk v segmentu	3008
Število točk v izrezu	351	Število točk po podložitvi ničel	1755
Spektralna resolucija	285Hz		

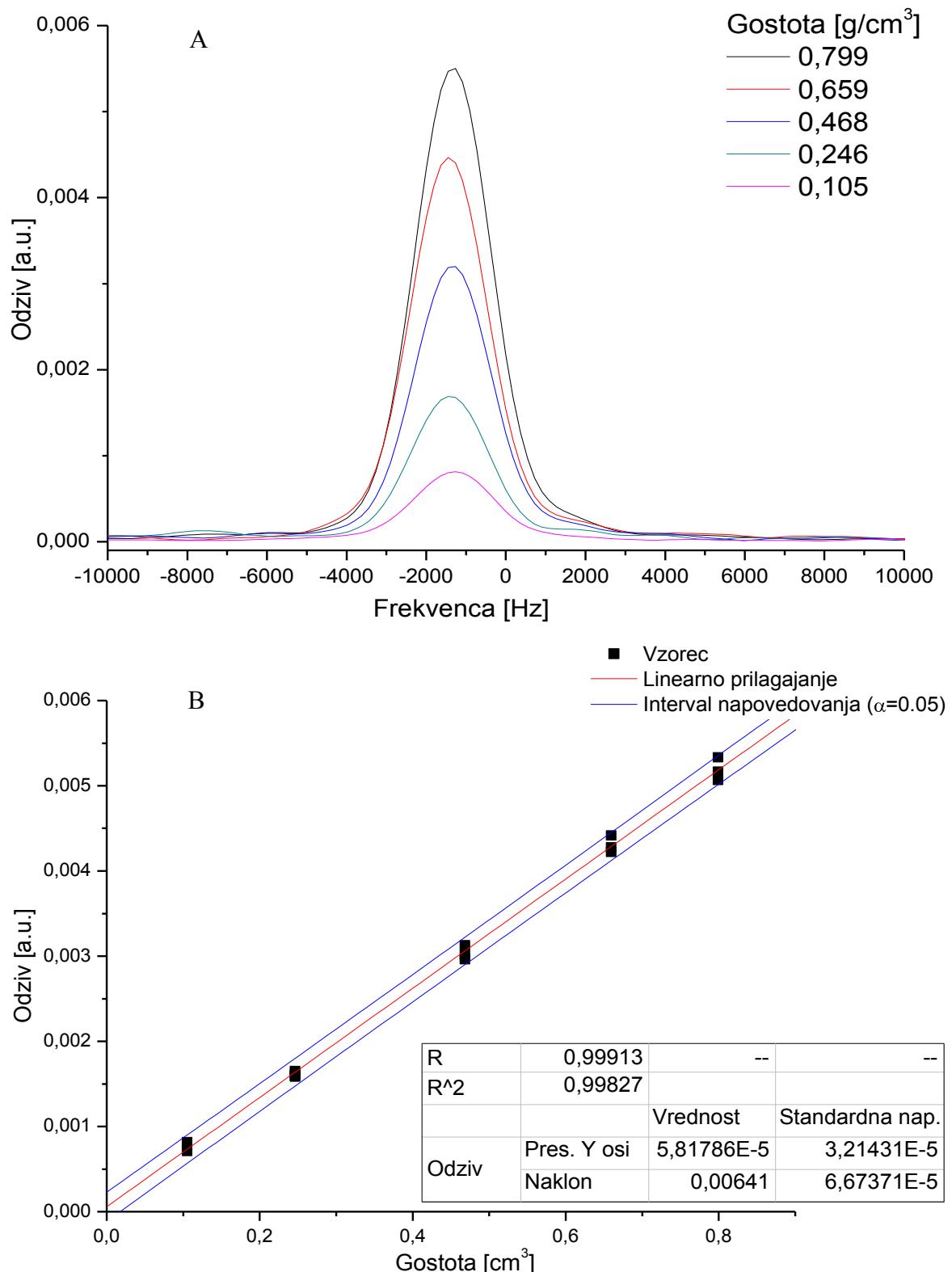


Slika 27. Posnetek  $^{14}\text{N}$  JKR odziva piroksikama I pri 2587kHz. Merili smo s sistemom 2 (referenčna frekvenca pri 2588kHz). Na A se za  $\pi$  pulzi vidi 10 odmevov, ki smo jih sešteli in povprečili (B), izrezali opazovani del (C) ter nanesli okno (D). Na koncu smo s pomočjo FFT dobili končni spekter (E).



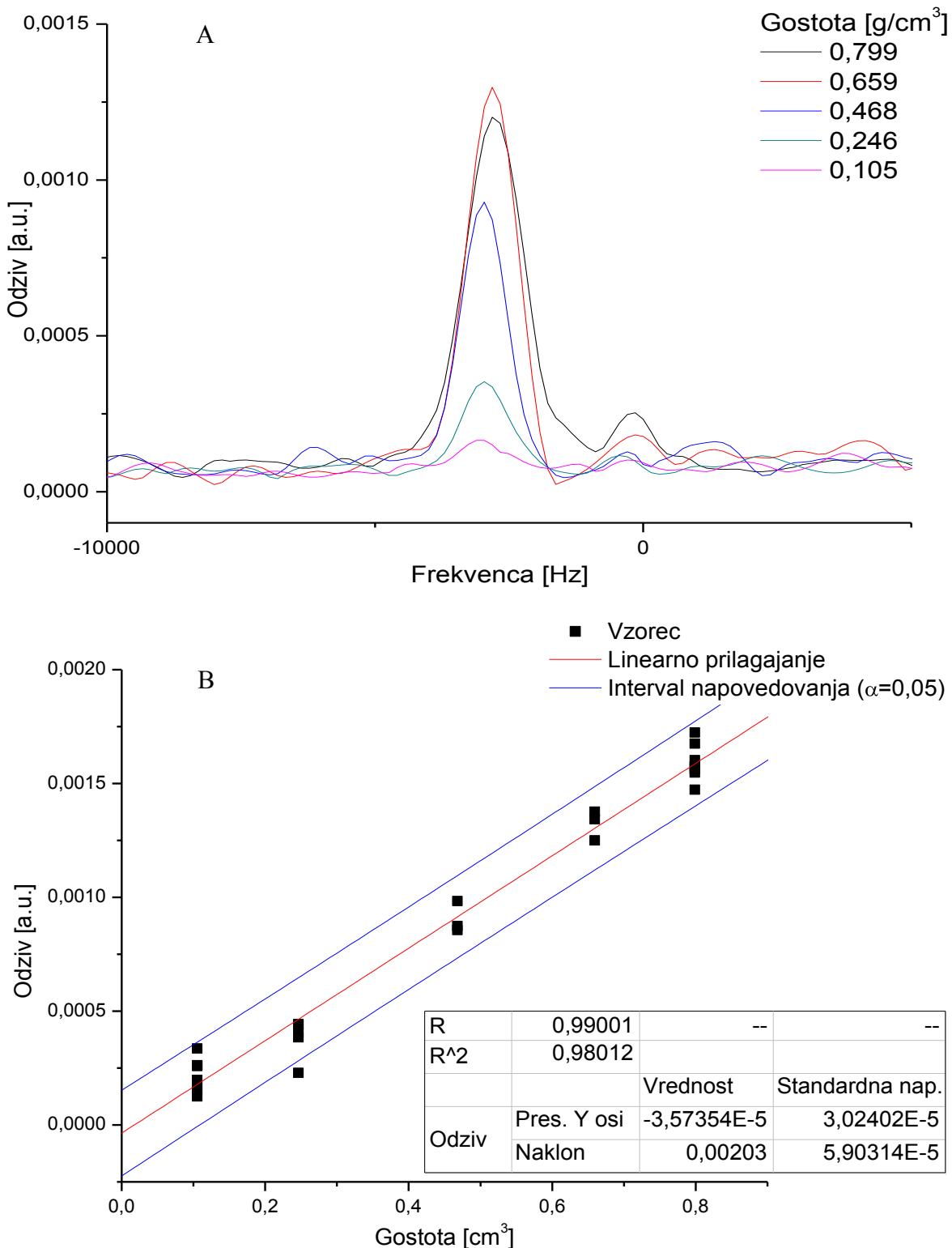
Slika 28. Posnetek  $^{14}\text{N}$  JKR odziva piroksikama I pri  $3439\text{kHz}$ . Merili smo s sistemom 2 (referenčna frekvence pri  $3441,2\text{kHz}$ ). Na časovnem poteku A se za  $\pi/2$  pulzi vidijo le FID precesirajočih dušikovih jeder. Obdelava podatkov s segmentacijo (B), izrezom (C), nanašanjem okna (D) in FFT (E) je enaka kot pri opazovanju in merjenju odmevov

### 6.2.3.1 KONCENTRACIJSKA ODVISNOST PRI 2587kHz



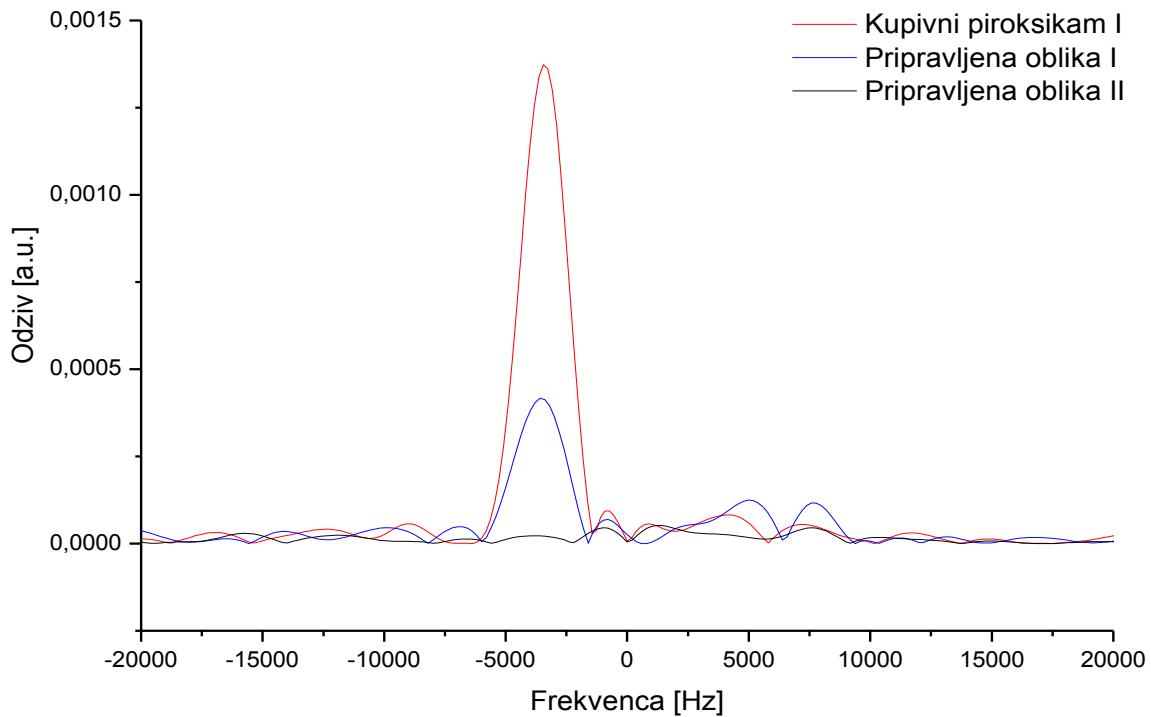
Slika 29. Slike prikazujeta koncentracijsko odvisnost  $^{14}N$  JKR resonančnega odziva piroksikama I pri 2587kHz. Merili smo s sistemom 2 (referenčna frekvenca pri 2588kHz).

### 6.2.3.2 KONCENTRACIJSKA ODVISNOST PRI 3439kHz



Slika 30. Sliki prikazujeta koncentracijsko odvisnost  $^{14}N$  JKR resonančnega odziva piroksikama I pri 3439kHz. Merili smo s sistemom 2 (referenčna frekvenca pri 3441,2kHz). Zaradi prekratkega  $T_2$  smo lahko uporabili le signal FID.

### 6.2.3.3 PREKRISTALIZIRANI OBLIKI I IN II PIROSIKAMA



*Slika 31. Merjenje resonančnega odziva  $^{14}\text{N}$  JKR prekrystaliziranih vzorcev piroksikama pri  $2587\text{kHz}$  s sistemom 2 (referenčna frekvenca pri  $2590\text{kHz}$ ). Dobljeni spekter prekrystalizirane oblike I je imel vrh pri enaki frekvenci kot referenčni vzorec dobavljenega piroksikama.. Razlika v višini je posledica manjše količine prekrystaliziranega vzorca. Spekter vzorca z obliko II ni dal vrhov.*

Sliki 27 in 28 prikazujeta značilne posnetke vzorcev čistega nifedipina I pri  $2587$  ter  $3439\text{kHz}$ .

Meritve odziva kvadrupolnih jader  $^{14}\text{N}$  v piroksikamu pri frekvencah  $2587$  ter  $3439\text{kHz}$  so potrdile odvisnost signala od gostote proučevanih atomskih jader v vzorcu (sliki 29 in 30). Pri tem se je signal povečeval linearno z večanjem gostote piroksikama (in posledično dušikovih jader). To pomeni, da se odziv povečuje linearno z višanjem števila resonančnih jader v volumnu tuljave. Za nadaljno kvantitativno proučevanje piroksikama bi bila ustreznješa nižja frekvenca pri  $2587\text{kHz}$ . Tukaj počasnejša spin-spinska relaksacija precesirajočih dušikovih jader omogoča opazovanje večjega števila odmevov. Le ti so manj kot FID podvrženi vplivom izzvenevanja vzbujevalnega dela sistema. Dodatno na njih vpliva tudi sama obdelava podatkov, še posebno nanos okna. Ti vplivi na poslabšanje

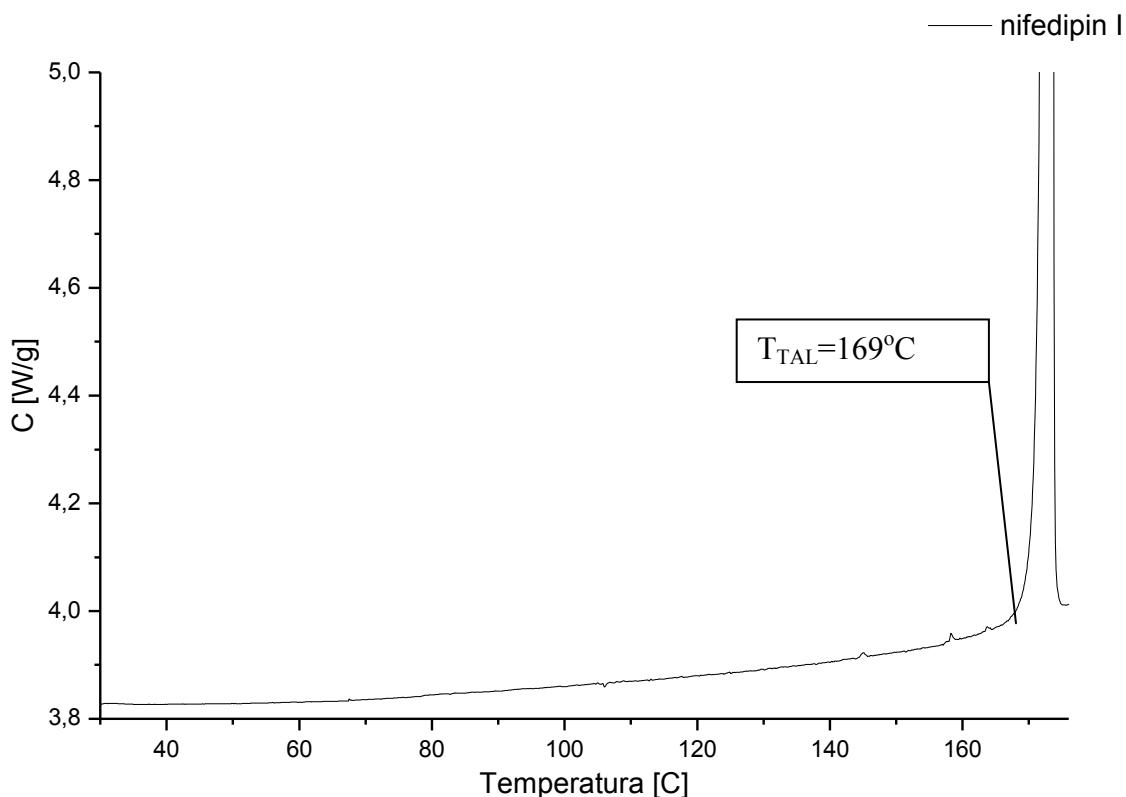
S/N razmerja so se lepo videli pri frekvenci 3439kHz, kjer smo opazovali in analizirali le FID (slika 28). Na grafu odvisnosti odziva od gostote resonantnih dušikovih jeder v vzorcu je prišlo do večjega sisanja izmerjenih vrednosti.

Pri  $^{14}\text{N}$  JKR frekvencah oblike I ( 2587kHz ter 3439kHz ) piroksikam II ter monohidratista imela odziva. Pri teh dveh frekvencah lahko z gotovostjo razločimo obliko I od preostalih dveh opazovanih oblik. Pri obliki I, prekristalizirani iz 1,2-dikloroetanola, smo na spektru pri 2587kHz opazili vrh, ki pa je bil zavoljo manjše količine prekristaliziranega vzorca manjši (slika 31).  $^{14}\text{N}$  JKR je tako potrdila istovetnost dobavljene oblike ter iz 1,2-dikloroetanola prekristalizirane oblike. To je v skladu z rezultati FT-IR merjenj, kjer smo ravno tako ugotovili istovetnost med oblikama (slika 26).

Poleg tega je odziv piroksikama pri 2587kHz relativno močan. Predstavitev odzivov v odvisnosti od koncentracije oblike I je razkrila linearen trend z visokim korelacijskim koeficientom  $R$ . Opazovanje pri tej frekvenci omogoča tako kvalitativno kot tudi kvantitativno določevanje piroksikama I v okviru gostot ter celokupne količine dušikovih jeder v tuljavi, kot smo jih imeli pri meritvah.

## 6.3 NIFEDIPIN

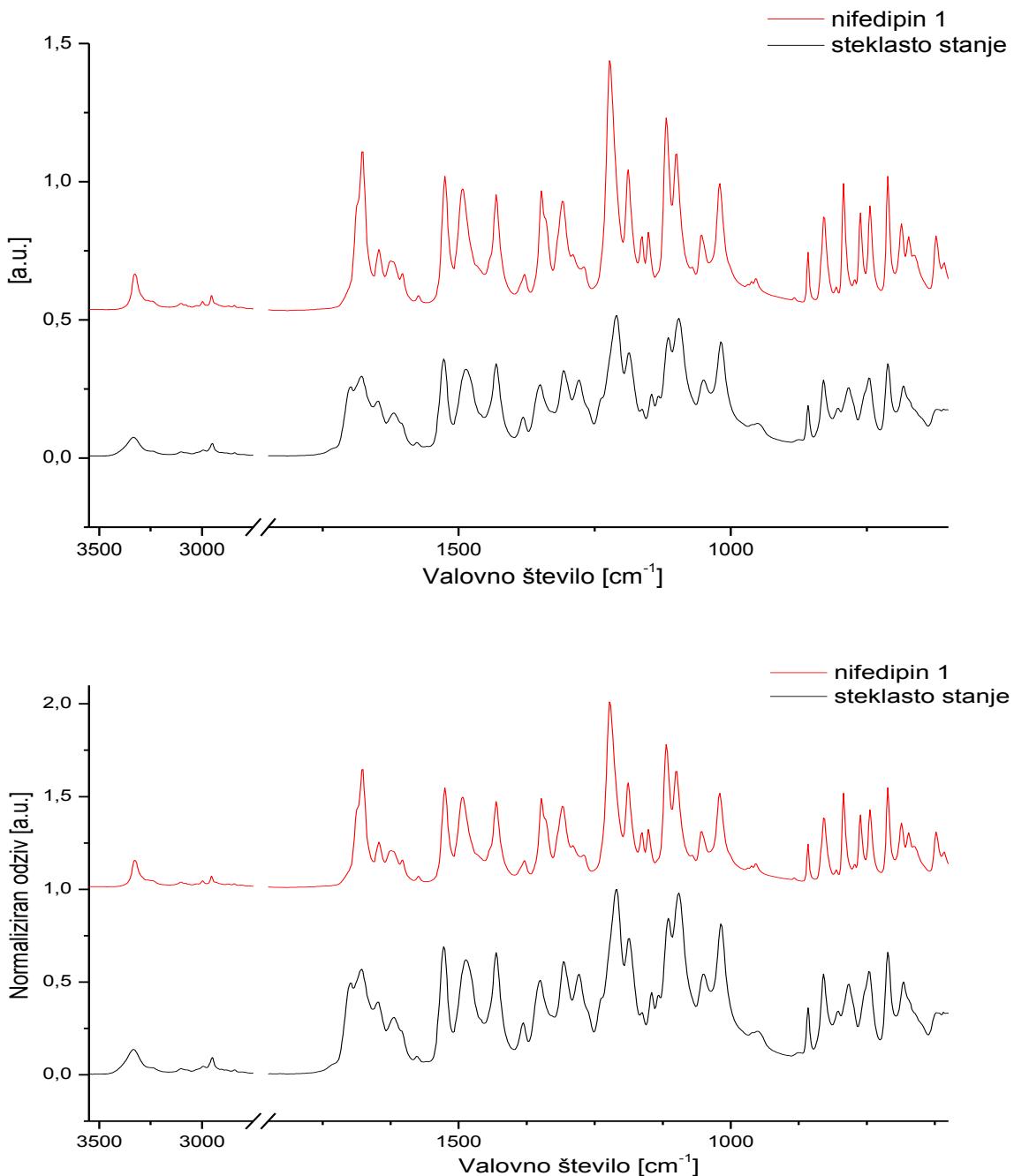
### 6.3.1 DSC



Slika 32. Graf prikazuje DSC zapis za na tržišču dobljiv nifedipin. Hitrost segrevanja je bila 5K/min.

DSC termogram je pokazal začetek taljenja pri  $169^{\circ}\text{C}$  s sredino vrha pri  $173^{\circ}\text{C}$  (slika 32). To je v skladu z literaturnimi podatki za nifedipin I (63-68). Na termogramu poleg glavnega vrha ni drugih, ki bi nakazovali na več različnih oblik nifedipina, zaostala topila ali večjo količino prisotnih nečistoč. Iz tega sledi, da je bil vzorec nifedipina v polimorfni obliki I, ki je tudi najbolj termodinamično stabilna.

### 6.3.2 IR



Slika 33 FT-IR spekter, posnet na dobavljenem vzorcu nifedipina ter pripravljeni steklasti oblici med 4000-600cm<sup>-1</sup>.

FT-IR spektra kažeta na razlike med steklasto fazo ter kristalno obliko I (slika 33). Razlike so opazne okoli 800, 1100-1300, 1600 ter 3300cm<sup>-1</sup>. Normalizirana IR spektra nazorneje pokažeta kvalitativne razlike v položaju ter razcepljenosti vrhov v spektru.

### 6.3.3 $^{14}N$ JKR

Vzorec nifedipina I je bil pregledan z dvojno resonanco na IJS. Meritve so bile opravljene pri sobni temperaturi. Najdene so bile verjetne  $^{14}N$  JKR resonance obeh dušikovih atomov nifedipina I (preglednica XIV).

*Preglednica XIV. V tabeli so podani rezultati okvirnega določevanja  $^{14}N$  jedrskih kvadrupolnih resonanc nifedipina I s pomočjo zaznavanja parametrov sklopite vodikovih jeder z  $^{14}N$  (metoda dvojne resonance). Meritve so razkrile verjetne kvadrupolne resonance dušika v nifedipinu v okolini 1MHz ter 2,5MHz.*

	$\nu_+$ [kHz]	$\nu_-$ [kHz]	$\nu_0$ [kHz]
N1	2590	2170	420
N2	1035	845	190

Zaradi tehničnih omejitev smo se osredotočili na iskanje zgornjih dveh kvadrupolnih resonanc. Predlagane resonančne frekvence smo podrobnejše iskali in okarakterizirali s pomočjo NQR sistemov 1 in 2. Našli in natančneje smo določili obe frekvenci.  $\nu_+$  se je nahajala pri 2590kHz,  $\nu_-$  pa pri 2170kHz. V tem primeru sta se obe frekvenci natančno ujemali z napovedjo metode dvojne resonance, vendar so takšni primeri redki. Dvojna resonanca včasih le omeji področje iskanja kvadrupolnih resonančnih frekvenc na odseke radiofrekvenčnega spektra z večjo gotovostjo zadetka.

#### 6.3.3.1 NIFEDIPIN I PRI 2590kHz

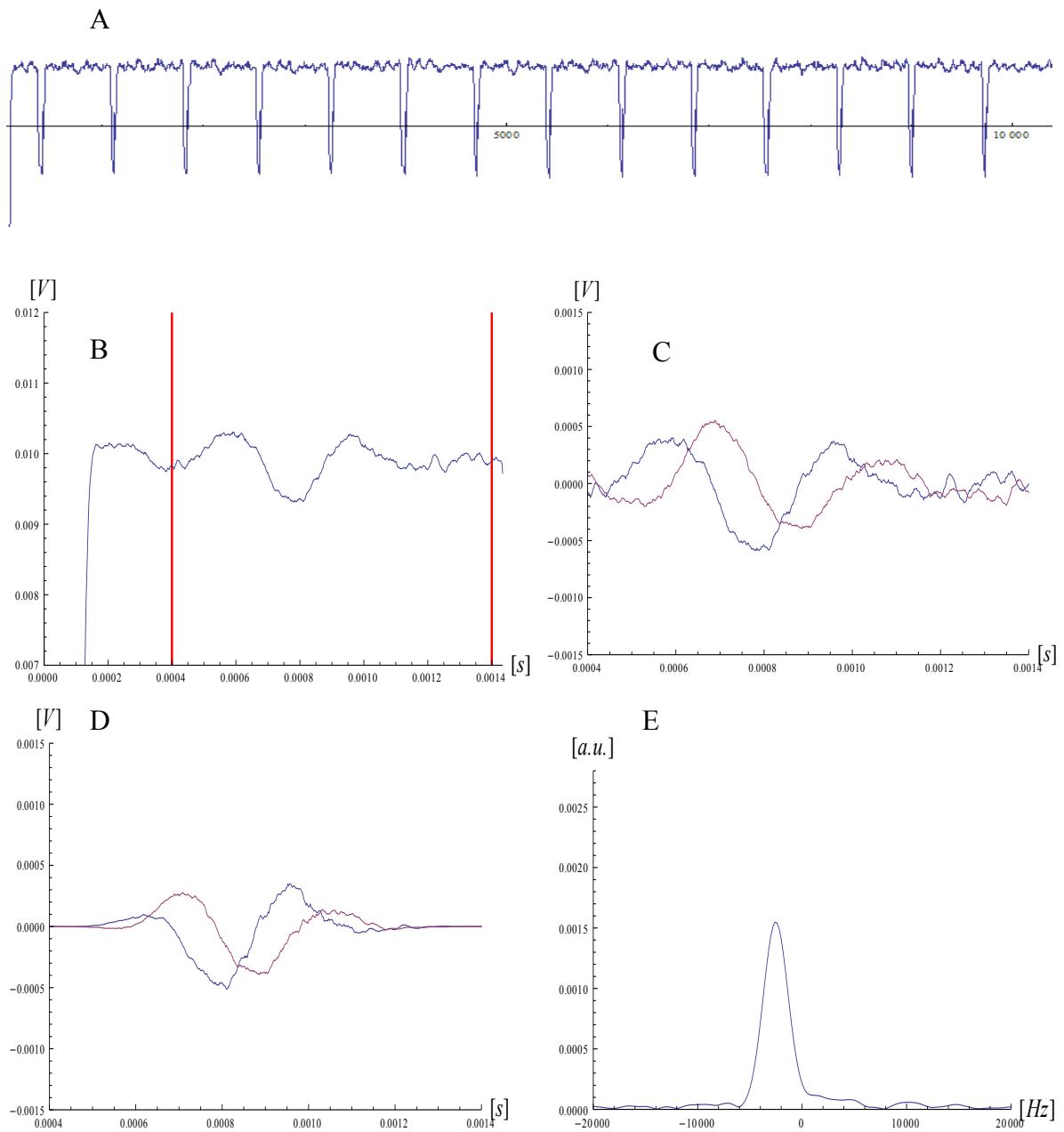
Nifedipin I ima pri 2590kHz dokaj izrazit vrh. Pri optimiziranju merjenja odziva kvadrupolnih dušikovih jeder nifedipina I smo spremajali:

- čas ponavljanja meritev,
  - število  $\pi$  pulzov v sekvenci,
  - število uporabljenih segmentov,
- oddaljenost referenčne frekvence od resonance.

Nastavitev, ki smo jih dobili v tem začetnem delu merjenja JKR odziva nifedipina I, smo nato uporabili tudi pri vseh nadalnjih merjenjih le-tega (preglednica XV) .

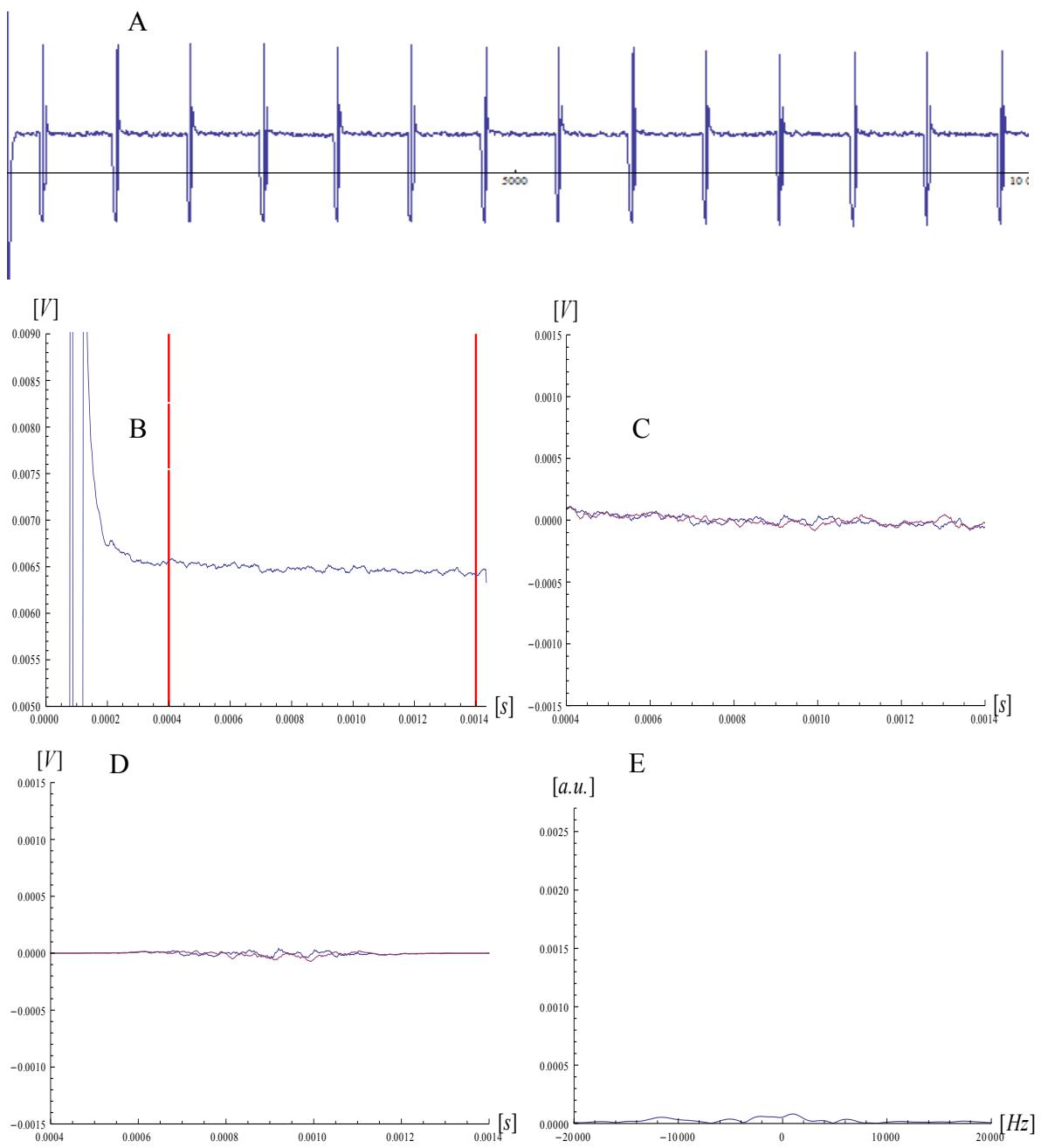
*Preglednica XV. Nastavitevni parametri NQR sistema 2 za spremeljanje  $^{14}N$  JKR signala nifedipina I.*

<b>Nastavitev NQR sistema 2</b>			
<b>Nastavitev vzbujevalno detekcijskega dela</b>			
Referenčna frekvenca	2592,8kHz	Čas ponavljanja meritev	1s
Število ponovitev	1000	Trajanje celotnega zajemanja	18min
Dolžina $\pi/2$ pulza	0,018ms	Dolžina $\pi$ pulza	0,036ms
Dolžina $\tau$	0,718ms	Hitrost vzorčenja A/D zajemalnika signala	0,002ms
Število $\pi$ pulzov	40	Temperatura	sobna (22-24C)
<b>Parametri obdelave podatkov</b>			
Število uporabljenih segmentov	25	Irez med točkama	$x_1=0,0004$ $x_2=0,0014$
Uporabljeno okno	blackman	Faktor števila ničel	4,00
<b>Lastnosti zapisa in obdelave podatkov</b>			
Dolžina zapisa časovne domene	0,058158s		
Število vseh točk	29079	Število točk v segmentu	718
Število točk v izrezu	501	Število točk po podložitvi ničel	2505
Spektralna resolucija	200Hz	S/N	$\approx 20$



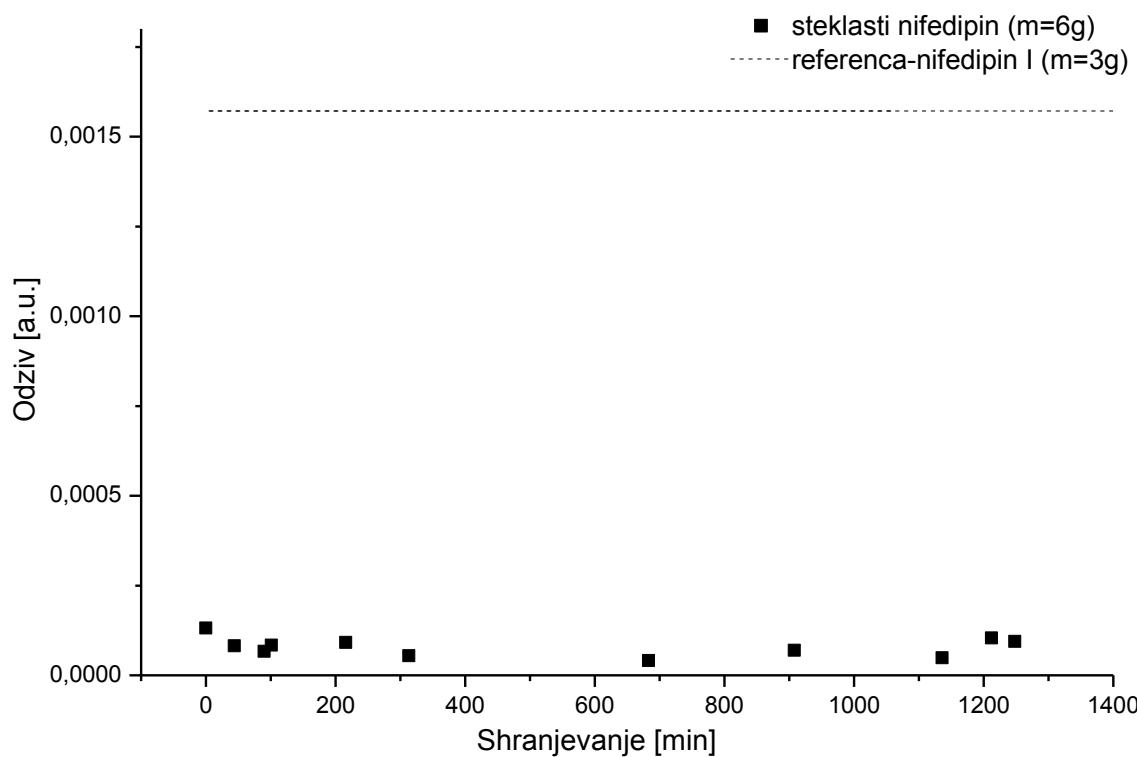
*Slika 34. Posnetek  $^{14}\text{N}$  JKR odziva nifedipina I pri 2590kHz. Merili smo s sistemom 2 (referenčna frekvenca pri 2592,8kHz).. Graf A prikazuje časovni zapis prvih trinajst  $\pi$  pulzov z zašumljenimi odmevi. Ugodna spin-spin relaksacija ( $T_2$  je relativno dolg) omogoča uporabo 25 segmentov sekvence pulzov. Ti sešesti segmenti so predstavljeni na grafu B, kjer je opaziti veliko izboljšanje S/N signala v primerjavi s posameznim segmentom v A. Na grafu C sta izrisana oba kanala kvadraturne detekcije (ki ju na A in B nismo izrisali, ker bi tako zmanjšali preglednost). D je le C pomnožen z Blackmannovim oknom, E pa je spektralna analiza (FFT) na D, ki prikaže lep vrh v spektru. Višino le-tega smo uporabili pri nadalnjem obravnavanju povezav znotraj opazovanega sistema.*

### 6.3.3.2 AMORFNO STANJE NIFEDIPINA



Slika 35. Posnetek  $^{14}\text{N}$  JKR odziva steklastega nifedipina pri  $2590\text{kHz}$ . Merili smo s sistemom 2 (referenčna frekvenca pri  $2592,8\text{kHz}$ ). Popolna odsotnost kakršnegakoli odmeva tako v zapisu celotne časovne domene zaporedja pulzov (A), kot tudi v segmentiranem delu (B). To se odraža tudi v spektru, ki razen šuma ne kaže vidnejših vrhov. Pri tem pa vzorec steklastega nifedipina vsebuje dvakrat toliko učinkovine kot referenčni vzorec (6g). Steklasta oblika nifedipina pri  $2590\text{kHz}$  in zgornjih nastavitevah NQR sistema 2 ne daje vidnih odmevov v časovni domeni kot posledično tudi ne vrhov v spektru.

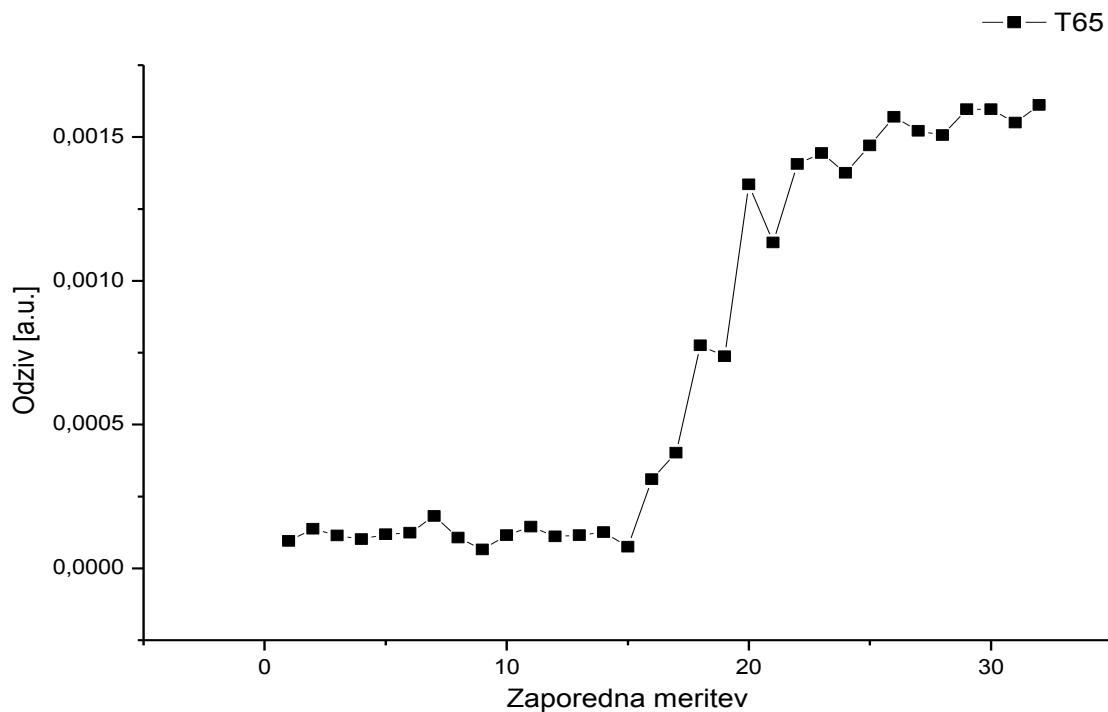
Na prejšnjih dveh slikah sta prikazana značilna posnetka čistega nifedipina I ter pripravljene steklaste oblike (sliki 34 in 35). Viden je lep vrh v spektru oblike I, medtem ko pri amorfni obliki vrhov ni. Z opazovanjem  $^{14}\text{N}$  JKR pri 2590kHz lahko ločimo amorfno stanje od oblike I.



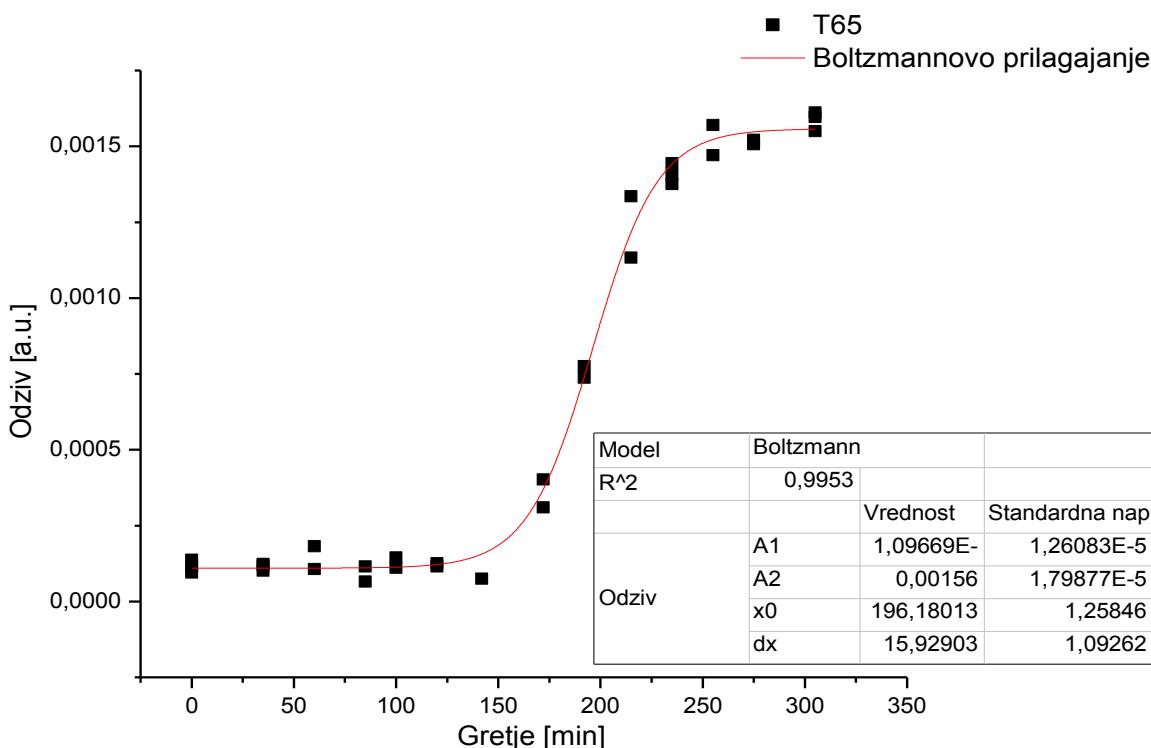
Slika 36. Graf prikazuje meritve vzorca steklastega nifedipina shranjevanega pri sobni temperaturi v odvisnosti od časa po pripravi steklastega vzorca. Ordinata predstavlja velikost najvišjega vrha v spektru. Primerjali smo z referenčnim vzorcem nifedipina I, katerega višino predstavlja črta.

V začetnem proučevanju stabilnosti steklastega nifedipina pri sobni temperaturi v danem obdobju opazovanja v vzorcu nismo zaznali nastanka nifedipina I (slika 36). To je pomenilo, da lahko v tem časovnem obdobju (vsaj en dan) nifedipin smatramo kot zamrznejn. Velikost vseh največjih odzivov v spektru steklastega nifedipina je bila na ravni šuma. To je potrditev literarnih podatkov, da je steklasti nifedipin pri sobni temperaturi stabilen najmanj nekaj dni (71). To nam je omogočilo serijo nadalnjih poskusov, kjer smo nifedipin greli na določeni temperaturi določeno število minut, potem pa smo vzorec v hladni tekoči vodi hitro ohladili na sobno temperaturo ter pomerili odziv.

### 6.3.3.3 PREHAJANJE AMORFNEGA NIFEDIPINA V OBLIKO I PRI 65C

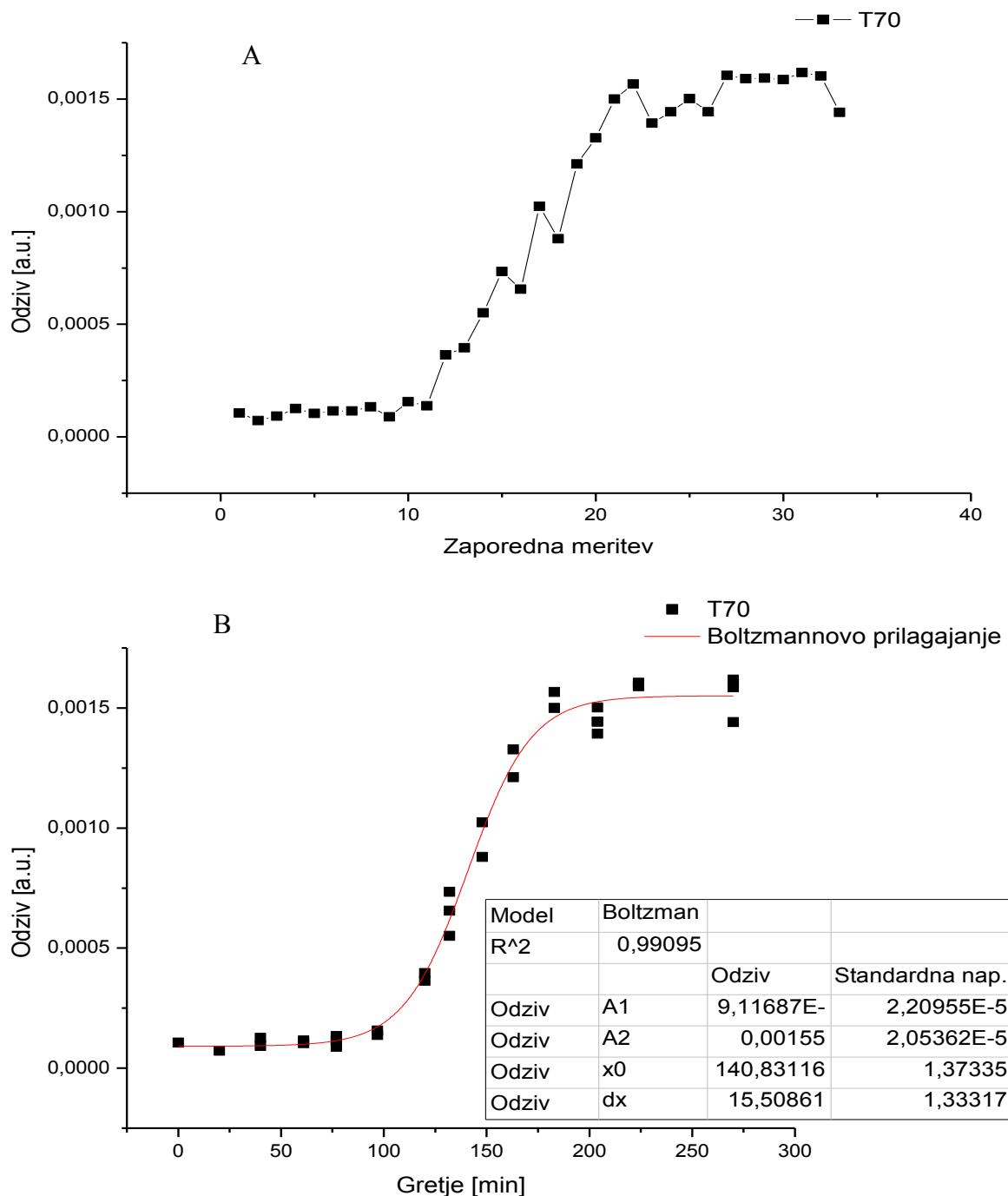


Slika 37. Graf prikazuje zaporedne meritve pri merjenju kristalizacije in hitrosti nastanka nifedipina I v odvisnosti od časa gretja pri  $65^{\circ}\text{C}$ . Po vsakem segrevanju smo vzorec ohladili na sobno temperaturo in vsakič pomerili JKR najmanj dvakrat, tako da smo se lahko prepričali, da se je nadaljni potek kristalizacije ustavil. Graf nudi vpogled v to s prikazom odvisnosti signala od zaporedne meritve. Lepo se vidijo koraki, kjer smo vzorec večkrat ponovno pomerili, in kjer se je kristalizacija ustavila. Večina odstopanj med temi meritvami izvira le iz samega postopka merjenja.



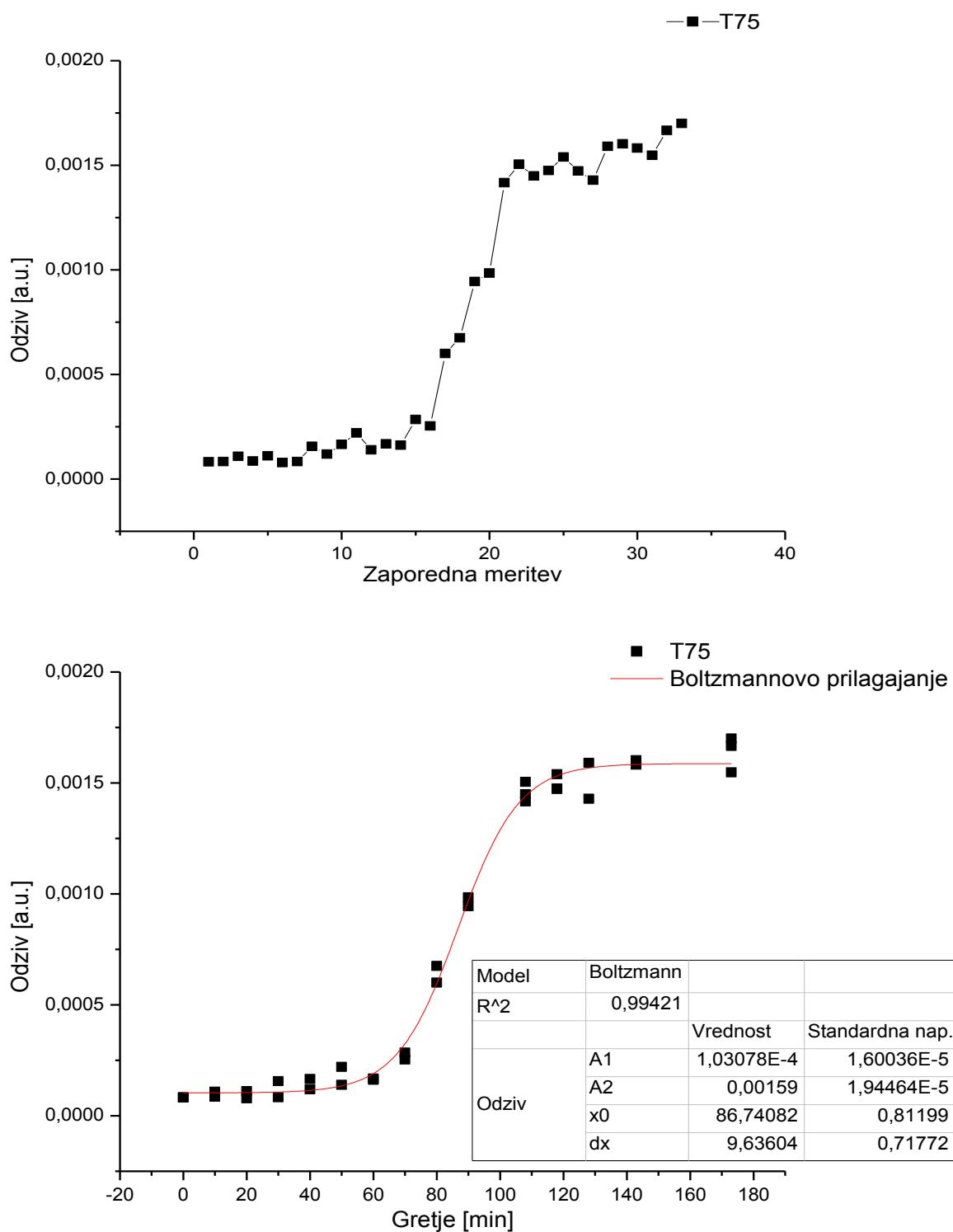
Slika 38. . Graf prikazuje kristalizacijo in nastanek polimorfa I v pripravljenem vzorcu steklaste oblike nifedipina. Točke prikazujejo odvisnost velikosti vrha v FFT spektru od celokupnega časa segrevanja pri  $65^\circ\text{C}$ . Predstavljena je odvisnost hitrosti in začetka kristalizacije od celokupnega trajanja gretja pri  $65^\circ\text{C}$ . Jakost signala smo dobili z odčitavanjem velikosti vrhov v FFT spektru. Kot se dobro vidi z grafa, ima odvisnost jakosti signala od časa gretja sigmoidno krivuljo. To je značilno za avtokatalitične procese, kamor spada tudi transformacija iz steklastega v kristalinično stanje. To je proces vrste trdno-trdno, ki vključuje dva koraka, nukleacijo ter rast kristalov (80-82). Za prileganje točkom smo uporabili Boltzmannovo sigmoidno krivuljo. Krivulja se lepo prilega z visokim koeficientom  $R^2$ .

#### 6.3.3.4 PREHAJANJE AMORFNEGA NIFEDIPINA V OBLIKO I PRI 70C



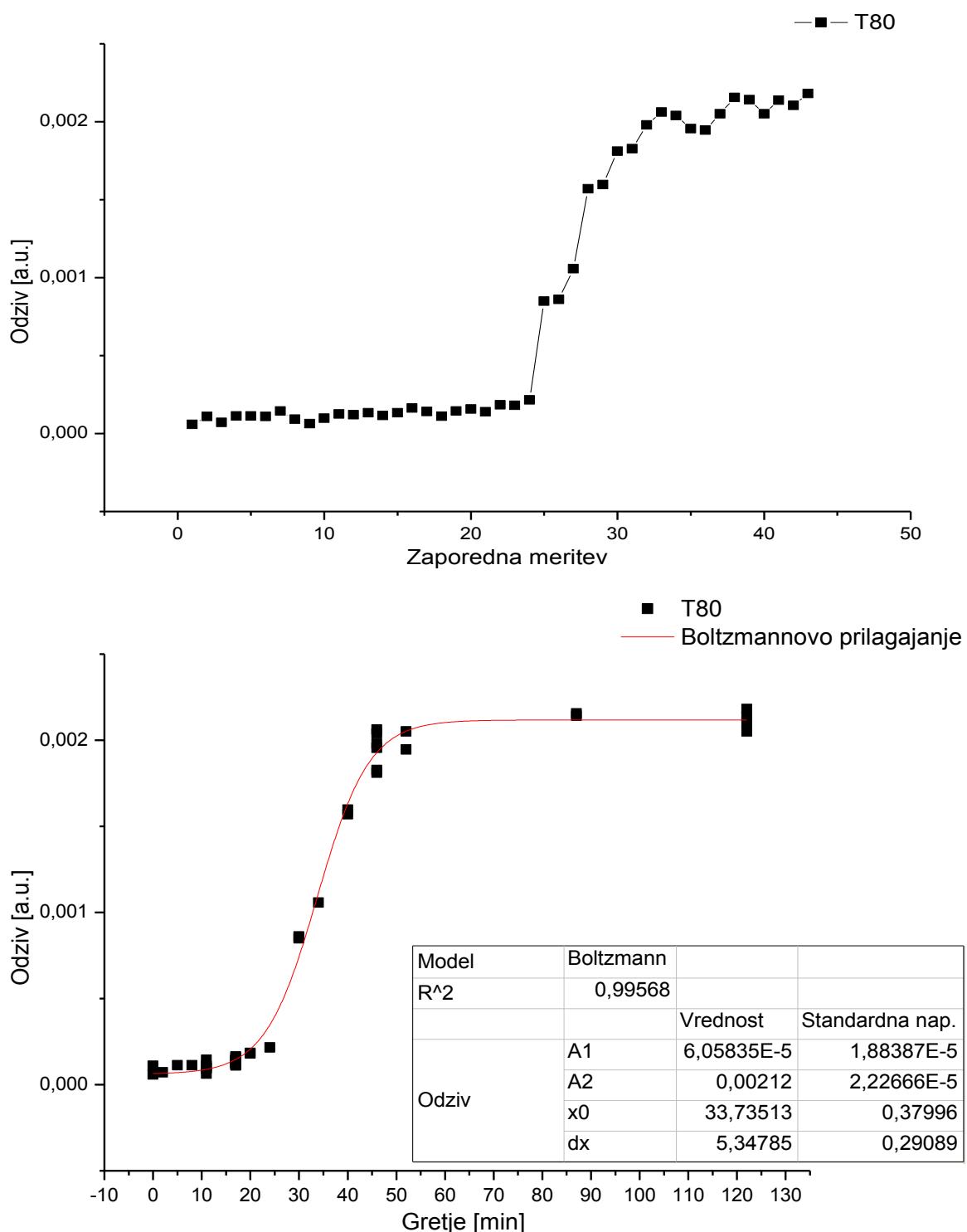
Slika 39. Odvisnost kristalizacije in hitrosti nastanka nifedipina I od časa gretja pri  $70^{\circ}\text{C}$ .

### 6.3.3.5 PREHAJANJE AMORFNEGA NIFEDIPINA V OBLIKO I PRI 75C



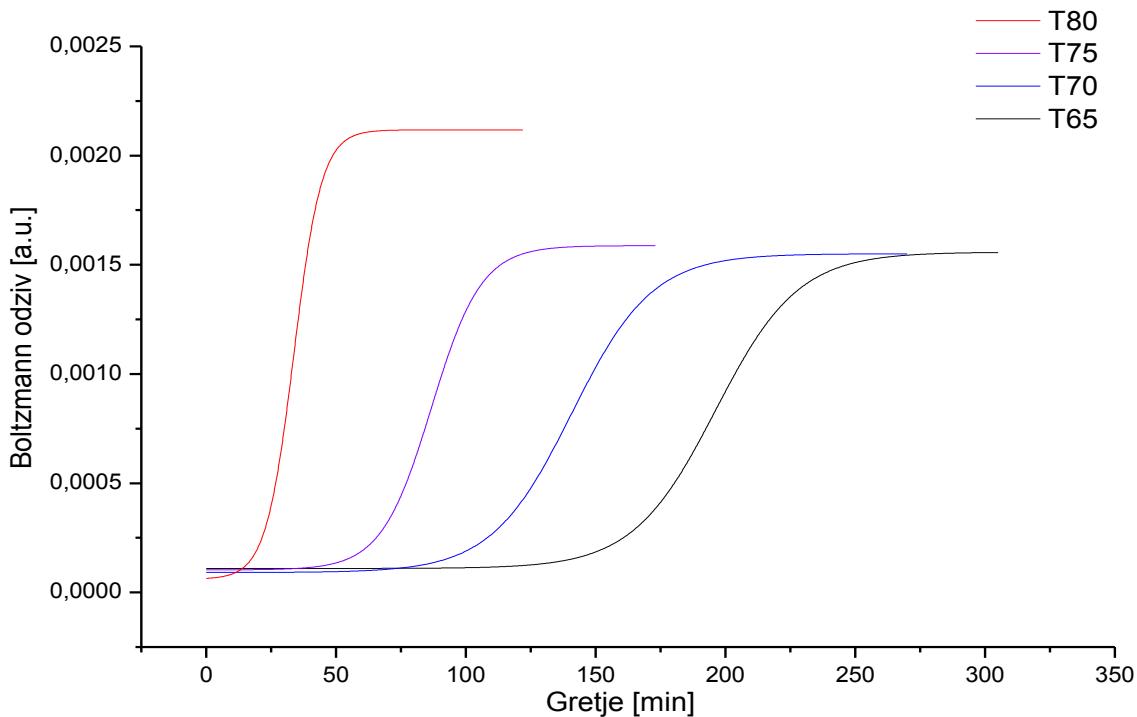
Slika 40. Odvisnost kristalizacije in hitrosti nastanka nifedipina I od časa gretja pri 75 °C.

### 6.3.3.6 PREHAJANJE AMORFNEGA NIFEDIPINA V OBLIKO I PRI 80C



Slika 41. Odvisnost kristalizacije in hitrosti nastanka nifedipina I od časa gretja pri 80 °C.

### 6.3.3.7 TEMPERATURNA ODVISNOST HITROSTI NASTAJANJA NIFEDIPINA I



Slika 42. Odvisnost hitrosti kristalizacije in količine kristalinične faze od temperature gretja. Na grafu so izrisane vse štiri prilegajoče se Boltzmannove sigmoidne krivulje, ki smo jih dobili iz meritev odvisnosti hitrosti nastajanja kristalne faze od časa gretja pri 65, 70, 75 in 80 °C. Vidijo se razlike tako v hitrosti kristalizacije kot tudi v višini platoja (količina nastalega nifedipina I).

Pri temperaturah 65-80°C smo lahko opazovali nastanek nifedipina I iz amorfne steklaste oblike (slike 37-41). Iz slik je razvidno, da sta se tako hitrost nastajanja kot tudi induksijski čas nukleacije spremnjala v odvisnosti od temperature in časa gretja.

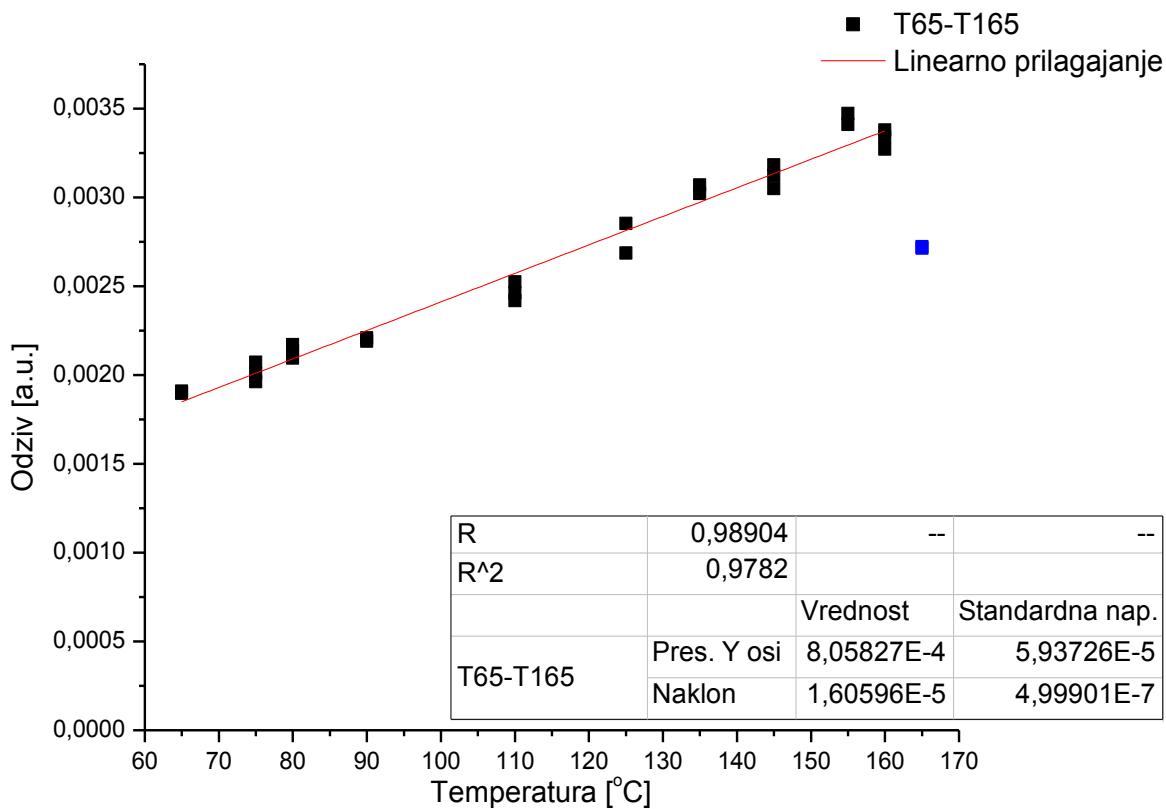
Plato je bil dosežen, ko se je hitra eksponentna faza pretvorbe zaključila. Nadaljnje naraščanje signala je bilo pri nadaljnem gretju izredno upočasnjeno. Pri primerjavi rezultatov gretja pri različnih temperaturah smo opazili, da se je plato ustalil pri višji vrednosti z višanjem temperature gretja (slika 42).

Ker je prišlo pri doseženih platojih do razlik, smo se odločili, da posnamemo temperaturno odvisnost teh doseženih platojev. Z dovolj dolgim segrevanjem pri določeni temperaturi smo dosegli zaključek hitre faze rasti in nastop platoja. Jakost signala (oz. višina platoja) v tej končni fazi pa je bila odvisna od temperature, pri kateri smo segrevali. Glede na

literaturne podatke steklasti nifedipin v nekaj minutah preide v kristalno obliko I pri temperaturah nad 90°C; tem hitreje, čim višja je temperatura (71). Pri teh temperaturah je sam proces kristalizacije nifedipina prehiter, tako da ga z našim postopkom priprave vzorcev in merjenja odzivov ne bi mogli opazovati. Ker se plato pri teh višjih temperaturah doseže zelo hitro, smo se odločili proučiti vpliv temperature na samo višino doseženega platoja pri posamezni temperaturi. Trajanje segrevanja pri posamezni temperaturi je navedeno v spodnji tabeli (preglednica XVI).

*Preglednica XVI. Preglednica prikazuje čase gretja pri posamezni temperaturi, pri katerih se je predpostavilo, da je plato dosežen. V tabeli je zapisan tudi  $^{14}N$  JKR odziv vzorca pri 2590kHz po vsakem gretju.*

Temperatura [C]	Čas gretja [min]	Odziv [a.u.]
65	740	0,0021
75	130	0,0020
80	70	0,0021
90	55	0,0022
110	45	0,0025
125	43	0,0029
135	35	0,0031
145	30	0,0031
155	30	0,0034
160	23	0,0034
165	30	0,0027



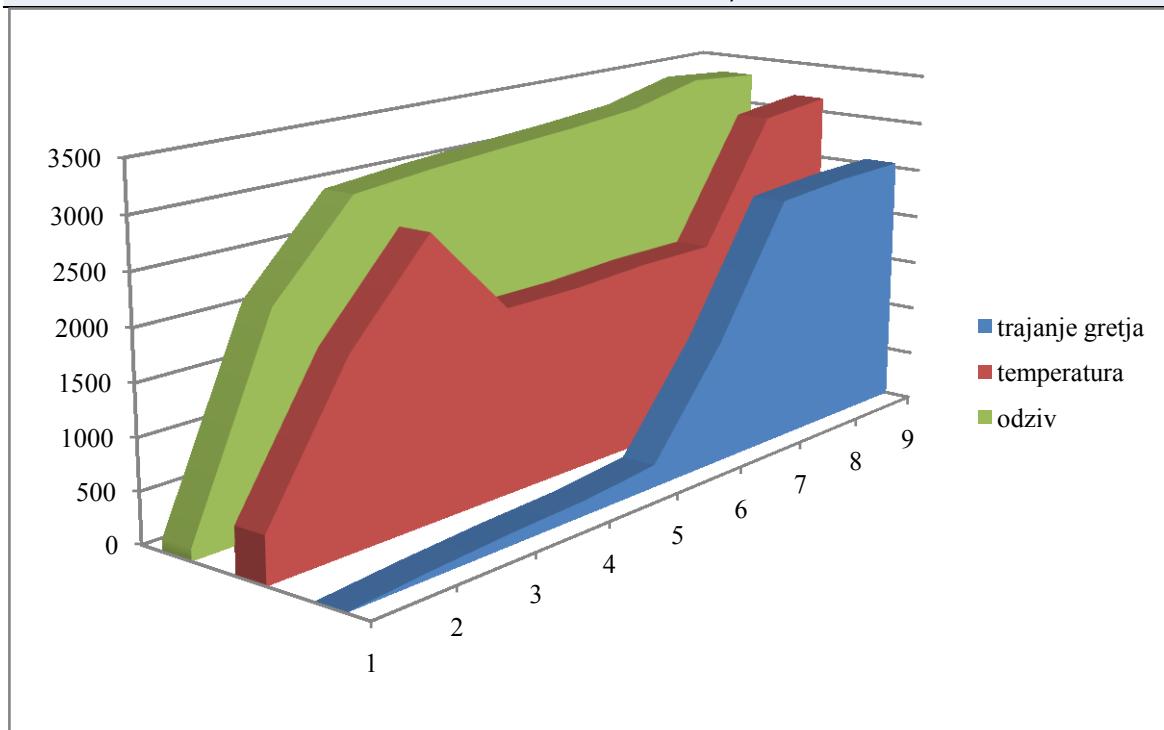
Slika 43. Odvisnost doseganja platojev od temperature gretja. Pri tem smo z ustreznim segrevanjem poskrbeli, da je hitri sigmoidni del procesa že potekel (nukleacija in rast kristalov). Pretvorba pa se je ustalila na počasno naraščajočem platoju. Na koncu grafa je opaziti odstopanje. Signal se je zmanjšal, ker je bilo to zadnje segrevanje zelo blizu tališča, kar je povzročilo prehod nekaj že nastalega nifedipina I v steklasto obliko pri hitrem ohlajanju vzorca.

Slika 43 podaja rezultate teh meritev. Vidi se, da se signal doseženega platoja z višanjem temperature segrevanja ( $65\text{--}160^\circ\text{C}$ ) skoraj še enkrat poveča. To bi lahko razložili z defekti v kristalni strukturi, ki upočasnjujejo nadaljnjo rast kristalov pri dani temperaturi. Povišanje temperature poveča mobilnost molekul v trdni snovi, kar omogoča sprostitev nastalih nepravilnosti ter nadaljevanje rasti kristalov. Na koncu smo opazili zmanjšanje signala, ki je bilo posledica dejstva, da se je nekaj rekristaliziranega nifedipina I pri končni temperaturi zaradi lokalnega pregreja stalilo, ter pri hitrem ohlajanju ponovno prešlo v steklasto stanje.

### 6.3.3.8 IREVERZIBILNOST PREHAJANJA STEKLASTEGA NIFEDIPINA V STABILNO OBLOKO I

Preglednica XVII. Rezultati meritev jakosti  $^{14}\text{NQR}$  signala pri kristalizaciji nastalega nifedipina I. Pri tem smo spremenjali temperaturo ter čas segrevanja vzorca. Zadna dva stolpca na desni predstavlja množenje z ustreznim faktorjem ( $20$  in  $10^6$ ). Tako smo dobili vrednosti enakega velikostnega razreda, ki so nam nato omogočile na enem grafu prikazati vpliv obeh parametrov na jakost signala.

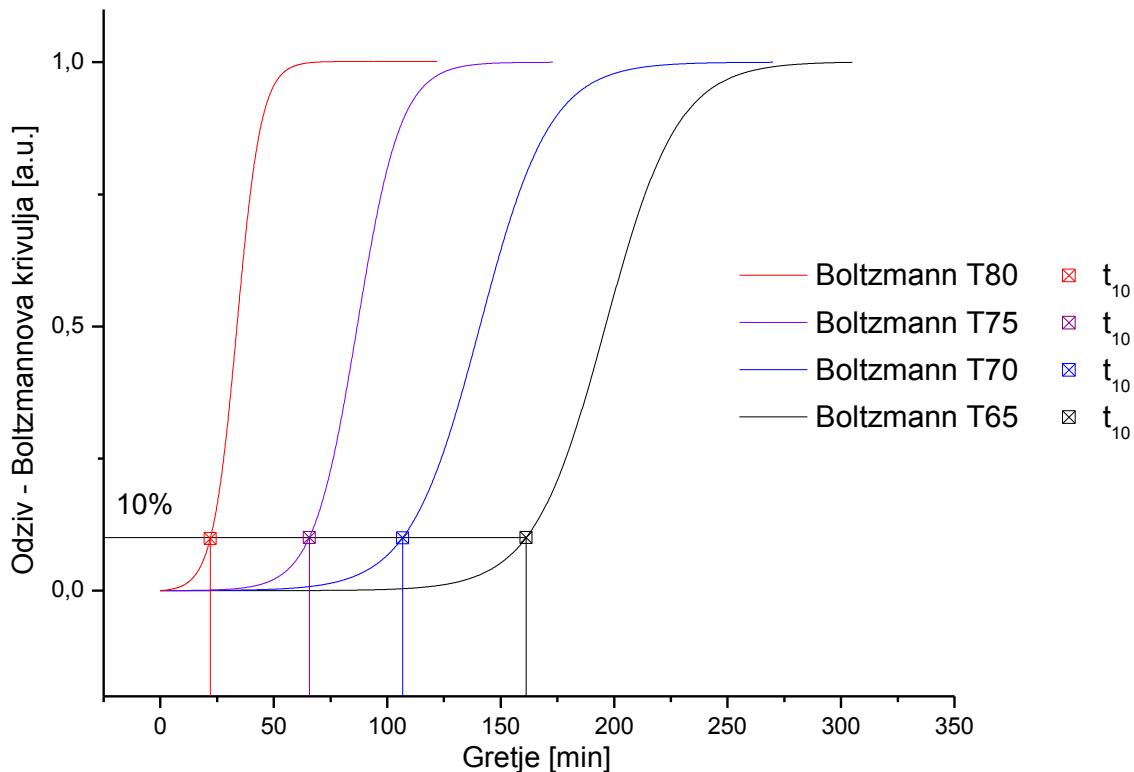
Meritev	Čas gretja [min]	Temperatura [ $^{\circ}\text{C}$ ]	Odziv [a.u.]	Temp*20	Odziv* $10^6$
1	0	23	0,0001	460	117
2	65	91	0,0021	1820	2091
3	115	136	0,0029	2720	2941
4	146	91	0,0030	1820	3020
5	221	91	0,0031	1820	3078
6	1211	93	0,0031	1860	3129
7	2462	93	0,0032	1860	3196
8	2522	153	0,0034	3060	3371
9	2542	157	0,0033	3140	3308



Slika 44. Graf združuje prikaze vpliva temperature ter trajanja gretja (moder in rdeč grafikon) na jakost signala (zelen grafikon). Os X [1,9] označuje spremembo vsaj enega od obeh parametrov opazovanja. Y[0,3500] označuje relativno mero sprememb posameznega parametra ter odziva. Jasno se vidi ireverzibilnost nastajanja najbolj stabilne oblike nifedipina, saj ponovno gretje pri nižji temperaturi (srednji del rdečega grafikona) ni temu ustrezno znižalo izmerjene jakosti signala.

Poleg tega smo napravili še meritev odvisnosti signala v primeru ponovnega segrevanja pri nižji temperaturi. S tem smo preverili, ali je naraščanje platojev pri temperaturah segrevanja povraten proces (preglednica XVII) (slika 44). Rezultati so potrdili nepovraten proces nastajanja oblike I pri temperaturah segrevanja.

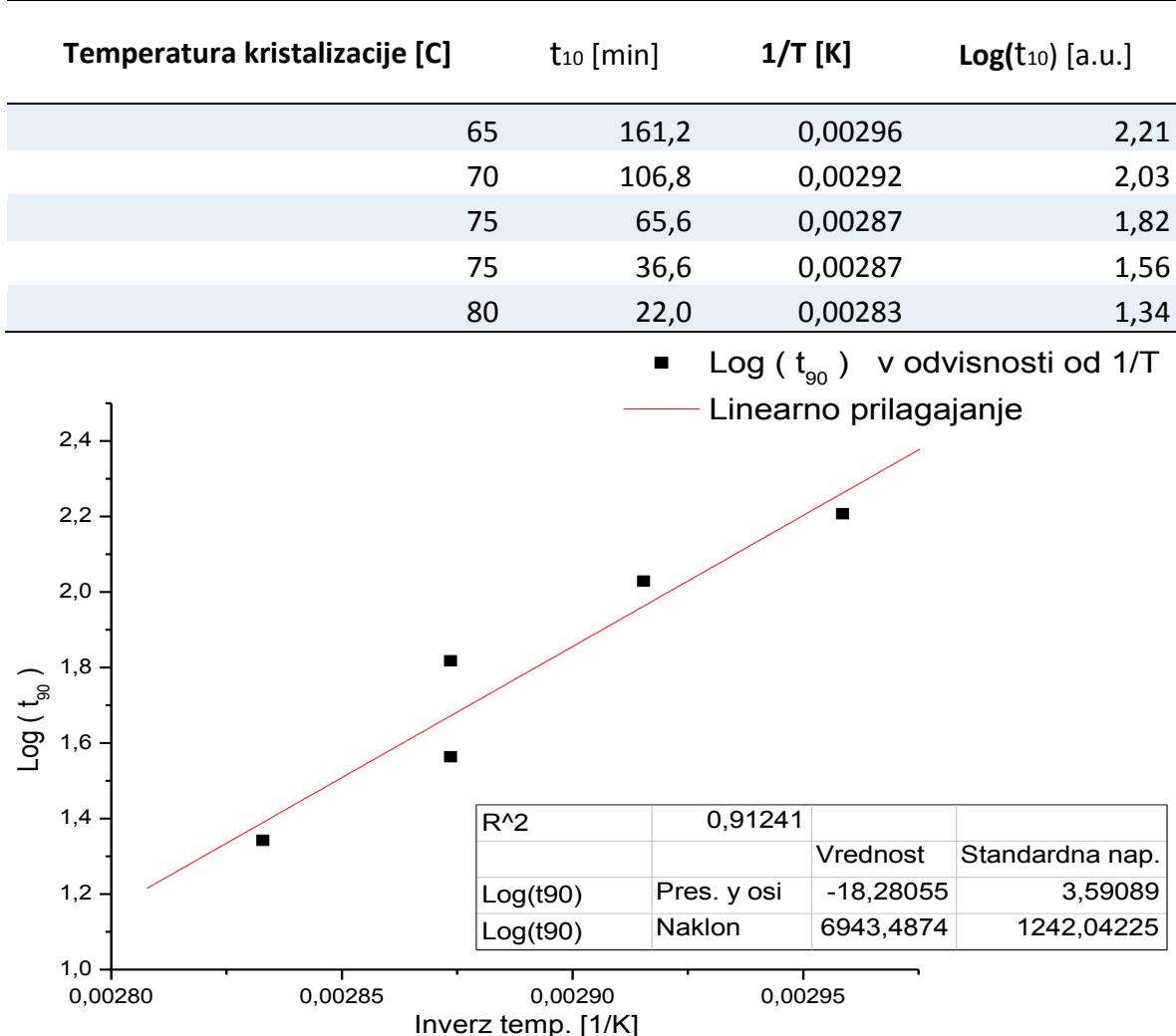
#### 6.3.3.9 PRIKAZ ODVISNOSTI $t_{10}$ OD TEMPERATURE KRISTALIZACIJE



Slika 45. Na grafu so normalizirane prilegajoče se Boltzmannove sigmoidne krivulje pri ustrezeni temperaturi kristalizacije nifedipina I. Dodatno so na krivuljah označene točke, pri katerih je prešlo 10 odstotkov (glede na doseženi plato) nifedipina v obliko I pri dani temperaturi. S projekcijo teh točk na abscisno os dobimo oceno za čas  $t_{10}$  pri ustrezeni temperaturi.

Iz prilegajočih se Boltzmannovih sigmoidnih krivulj smo ocenili tudi  $t_{10}$ . To je čas, pri kateri je količina novonastale kristalne faze enaka 10% platoja. Pri procesu kristalizacije ta čas predstavlja ločnico med počasno ter hitro eksponentno fazo procesa. Čim daljši je ta čas pri dani temperaturi, tem počasnejša je kristalizacija.  $t_{10}$  se z višanjem temperature krajša (slika 45), kar je posledica povečane mobilnosti molekul nifedipina v trdni snovi, kar povzroči hitrejše prehajanje v druge oblike.

Preglednica XVIII. S pomočjo prilegajočih se premic Boltzmannove sigmoidne krivulje smo ocenili  $t_{10}$  pri opazovanih temperaturah kristalizacije nifedipina I.



Slika 46. Prikaz logaritemske odvisnosti  $t_{10}$  od obratne vrednosti absolutne temperature.

V preglednici XVIII so prikazane ocnjene vrednosti  $t_{10}$ . Glede na literaturne podatke naj bi bila  $t_{10}$  in obratna vrednost absolutne temperature v logaritemsko linearni zvezi (71). V dveh skrajno desnih stolpcih se nahajajo temu ustrezno preračunane vrednosti. Na grafu prikazan trend naraščanja se je skladal z literaturnimi podatki (71). Koeficient določenosti  $R^2$  je relativno nizek, kar je posledica majhnega števila meritev in težavnega nadzora nad lokalno temperaturo ter hitrostjo segrevanja in hlajenja vzorca.

Predstavljeno opazovanje kristalizacije nifedipina je tako prikazalo novo možnost uporabe  $^{14}\text{N}$  JKR za proučevanje dinamičnih procesov v trdni snovi.

## 7 SKLEP

V okviru diplomske naloge smo proučevali uporabo metode  $^{14}\text{N}$  JKR na treh farmacevtskih učinkovinah: sulfanilamid, piroksikam ter nifedipin. Ugotovili smo naslednje:

- Našli smo  $\nu_+$   $^{14}\text{N}$  JKR frekvence piroksikama (2587kHz in 3439kHz) ter nifedipina (2590kHz)
- Z metodo  $^{14}\text{N}$  JKR lahko ločimo med sulfanilamidom  $\alpha$  ter  $\beta$  pri resonančnih frekvencah oblike  $\beta$  (3072 in 3424kHz)
- Z metodo  $^{14}\text{N}$  JKR lahko razlikujemo piroksikam I od oblike II ter monohidrata pri resonančnih frekvencah oblike I (2587 in 3439kHz).
- Z metodo  $^{14}\text{N}$  JKR lahko razlikujemo nifedipin I od steklaste oblike pri resonančni frekvenci oblike I (2590kHz).
- $^{14}\text{N}$  JKR je sposobna razlikovati med različnimi znanimi polimorfnimi oblikami. Pri tem moramo poznati resonančne frekvence vsaj enega polimorfa. Poleg tega moramo tudi vedeti, ali imajo ostale oblike mogoče tudi resonančne frekvence na enakem mestu.
- Odvisnost odziva  $^{14}\text{N}$  JKR piroksikama I pri 2587kHz od njegovega deleža v mešanici z monohidratom, je pokazala lep linearen trend z velikim korelacijskim koeficientom.
- Odvisnost odziva  $^{14}\text{N}$  JKR prioksikam oblike I pri 3439kHz od njene deleža v mešanici z monohidratom je prikazala linearen trend. Vendar pa smo zaradi kratkega  $T_2$  lahko opazovali le FID, kar je vodilo do poslabšanja razmerja S/N.
- Z metodo  $^{14}\text{N}$  JKR se da opazovati dinamične procese nastajanja nifedipina I pri njegovi resonančni frekvenci 2590kHz. Pogoj je, da nadaljne spremembe v vzorcu med meritvijo ne potekajo. Ta pogoj je pri nifedipinu v času trajanja meritev dosežen že pri sobni temperaturi.
- Z metodo  $^{14}\text{N}$  smo lahko grobo ocenili  $t_{10}$  nastanka nifedipina I iz steklaste oblike.

## 8 LITERATURA

1. **C. A. Bertulani**, *Nuclear Physics in a Nutshell*. New Jersey : Princeton University Press, 2007.
2. **J.-L. Basdevant et al.**, *Fundamentals In Nuclear Physics*. New York : Springer Science+Business Media, 2005.
3. **E. A. C Lucken**, *Nuclear Quadrupole Coupling Constants*. London : Academic Press Inc., 1969.
4. **T. P. Das et al.**, *Nuclear Quadrupole Resonance Spectroscopy*. London : Academic Press, 1958.
5. **H. Chihara et al.**, *Nuclear Quadrupole Resonance Spectroscopy Data*. : Springer, 1997.
6. **P. Atkins et al.**, *Atkins' Physical Chemistry Seventh Edition*. New York : Oxford University Press, 2002.
7. **M. H. Levitt**, *Spin Dynamics: Basics of Nuclear Magnetic Resonance Second Edition*. Chichester : John Wiley & Sons, 2008.
8. **B. Blumich et al.**, *Mobile Single-Sided NMR*. Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy, 2008, Zv. 52, str. 197-269.
9. **P. M. Chaikin et al.**, *Principles of Condensed Matter Physics*. Cambridge : Cambridge University Press, 1995.
10. **H. G. Brittain.**, *Polymorphism in Pharmaceutical Solids*. New York : Marcel Dekker, 1999.
11. **R. Hilfiker.**, *Polymorphism in the Pharmaceutical Industry*. Weinheim : Wiley-VCH Verlag, 2006.
12. **A. Gavezzotti**, *Molecular Aggregation*. New York : Oxford University Press, 2007.
13. **A. Burger et al.**, *On the Polymorphism of Pharmaceuticals and Other Molecular Crystals. I* : Microchimica Acta, 1979, Zv. 72, str. 259-271.

14. **S. Bates et al.**, *Analysis of Amorphous and Nanocrystalline Solids from Their X-Ray Diffraction Patterns*. : Pharmaceutical Research, 2006, Zv. 23., str. 2333-2349.
15. **A. M. Kaushal et al.**, *Thermodynamic behavior of glassy state of structurally related compounds*. : European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, 2008, Zv. 69, str. 1067-1076.
16. *The British Pharmacopoeia*, 2007, British Pharmacopoeia Commission, The Stationery Office, 2007
17. **E. N. Kaufmann**, *Characterization of Materials, Volume I*. New Jersey : John Wiley & Sons, 2003.
18. **A. J. Hickey et al.**, *Pharmaceutical Process Engineering*. New York : Marcel Dekker, 2001.
19. **A. Bauer-Brandl**, *Polymorphic transitions of cimetidine during manufacture of solid dosage forms*. : International Journal of Pharmaceutics, 1996, Zv. 140, str. 195-206.
20. **D. Kashchiev et al.**, *Nucleation in solutions revisited*. : Crystal Research and Technology, 2003, Zv. 38, str. 555-574.
21. . **C. P. M. Roelands et al.**, *Development of an Experimental Method to Measure Nucleation Rates in Reactive Precipitation*. : Crystal Growth & Design, 2004, Zv. 4, str. 921-928.
22. **C. P. M. Roelands et al.**, *Analysis of Nuclation Rate Measurements in Precipitation Processes*. : Crystal Growth & Design, 2006, Zv. 6, str. 1380-1392.
23. **B. C. Hancock et al.**, *Characteristics and Significance of the Amorphous State in Pharmaceutical Systems*. : Journal of Pharmaceutical Sciences, 1997, Zv. 86., str. 1-12.
24. **D. Q. M. Craig et al.**, *The relevance of the amorphous state to pharmaceutical dosage forms: glassy drugs and freeze dried systems*. : International Journal of Pharmaceutics, 1998, Zv. 179, str. 179-207.
25. **D. Zhou et al.**, *Physical Stability of Amorphous Pharmaceuticals: Importance of Configurational Thermodynamic Quantities and Molecular Mobility*. : Journal of Pharmaceutical Sciences, 2002, Zv. 91, str. 1863-1872.

26. **V. Andronis et al.**, *Crystal nucleation and growth of indomethacin polymorphs from the amorphous state*. : Journal of Non-Crystalline Solids, 2000, Zv. 271, str. 236-248.
27. **B. C. Hancock et al.**, *Molecular Mobility of Amorphous Pharmaceutical Solids Below Their Glass Transition Temperatures*. : Pharmaceutical Research, 1995, Zv. 12, str. 799-806.
28. **C. Bhugra et al.**, *Prediction of Onset of Crystallization from Experimental Relaxation Times I-Correlation of molecular Mobility from Temperatures Above Glass Transition to Temperatures Below the Glass Transition*. : Pharmaceutical Research, 2006, Zv. 23, str. 2277-2290.
29. **B. Rodriguez-Sping et al.**, *General principles of pharmaceutical solid polymorphism: a supramolecular perspective*. : Advanced Drug Delivery Reviews, 2004, Zv. 56, str. 241-274.
30. **R. J.D. Tilley**, *Crystals and Crystal Structures*. Chichester : John Wiley & Sons, 2006.
31. **U. Shmueli**, *IUCr Texts on Crystallography: Theories and Techniques of Crystal Structure Determination*. Oxford : Oxford University Press, 2007.
32. **R. E. Dinnebier et al.**, *Powder Diffraction Theory and Practice*. Cambridge : The Royal Society of Chemistry, 2008.
33. **W. I. F. David et al.**, *IUCr Monographs on Crystallography 13: Structure Determination from Powder Diffraction Data*. Oxford : Oxford University Press, 2002.
34. **M. Blanco et al.**, *Characterization and analysis of polymorphs by near-infrared spectrometry*. : Analytica Chimica Acta, 2004, Zv. 502, str. 221-227.
35. . **A. D. Patel et al.**, *Low-Level Determination of Polymorph Composition in Physical Mixtures by Near-Infrared Reflectance Spectroscopy* : Journal of Pharmaceutical Sciences, 2001, Zv. 90, str. 360-370.
36. **P. F. Taday**, *Application of Terahertz Spectroscopy to Pharmaceutical Sciences*. : Philosophical Transactions: Mathematical, Physical and Engineering Sciences, 2004, Zv. 362, str. 351-364.

37. **A. Jakobsson et al.**, *Exploiting Temperature Dependency in the Detection of NQR Signals*. : Transactions on Signal Processing, 2005, Zv. 4, str. 653-656.
38. **E. Balchin et al.**, *Potential of Nuclear Quadrupole Resonance in Pharmaceutical Analysis*. : Analytical Chemistry, 2005, Zv. 77, str. 3925-3930.
39. **S. C. Perez et al.**, *Utilization of pure nuclear quadrupole resonance spectroscopy for the study of pharmaceutical crystal forms*. : International Journal of Pharmaceutics, 2005, Zv. 298, str. 143-152.
40. **L. Cerioni et al.**, *DTA and NQR studies of polymorphism in p-chlorofluorobenzene*. : Journal of Physics and Chemistry of Solids, 2004, Zv. 65, str. 1133-1140.
41. **J. N. Latosinska**, *Nuclear Quadrupole Resonance spectroscopy in studies of biologically active molecular systems - a review*. : Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2005, Zv. 38, str. 577-587.
42. **G. Fisher et al.**, *A versatile computer-controlled pulsed nuclear quadrupole resonance spectrometer*. : Review of Scientific Instruments, 1999, Zv. 70, str. 4676-4681.
43. **M. Onda et al.**, *Microwave spectrum and quadrupole coupling constant of 2,3-difluorobenzonitrile*. : Journal of Molecular Structure, 2002, Zv. 612, str. 167-170.
44. **J. Seliger et al.**, *<sup>14</sup>N nuclear quadrupole resonance of picolinic, nicotinic, isonicotinic and dinicotinic acids*. : Chemical Physics, 2006, Zv. 331, str. 131-136.
45. **C. R. Hernan et al.**, *Determination of the electric field gradient tensor by 2D NQR*. : Solid State Communications, 1997, Zv. 103, str. 483-488.
46. **J. Seliger et al.**, *<sup>14</sup>N NQR study of nicotinamide and related compounds*. : Magnetic Resonance in Chemistry, 2007, Zv. 46, str. 58-62.
47. **S. D. Somasundaram et al.**, *Analysis of nuclear quadrupole resonance signals from mixtures*. : Signal Processing, 2008, Zv. 88, str. 146-157.
48. **M. D. Esrafil et al.**, *Theoretical <sup>14</sup>N nuclear quadrupole resonance parameters for sulfa drugs: Sulfamerazine and sulfathiazole*. : Journal of Molecular Graphics and Modelling, 2008, Zv. 27, str. 326-331.

49. **T. M. Osan et al.**, *NQR: From imaging to explosives and drug detection.* : Physica B, 2007, Zv. 389, str. 45-50.
50. **Y. Jinon**, *Counterterrorist Detection Techniques of Explosives.* Amsterdam : Elsevier B. V., 2007.
51. **S. R. Byrn et al.**, *Solid-State Chemistry of Drugs Second Edition.* West Lafayette : SSCI Inc., 1999.
52. **S. Toscani et al.**, *Thermodynamic Study of Sulfanilamide Polymorphism: (I) Monotropy of the  $\alpha$ -Variety.* : Pharmaceutical Research, 1995, Zv. 12., str. 1453-1456.
53. **S. Toscani et al.**, *Polymorphism of Sulfanilamide: (II) Stability Hierarchy of  $\alpha$ -,  $\beta$ - and  $\gamma$ - Forms from Energy Calculations by the Atom-Atom Potential Method and from the Construction of the  $p, T$ , Phase Diagrams.* : Pharmaceutical Research, 1996, Zv. 13., str. 151-154.
54. **A. K. Sheridan et al.**, *Kinetics of the Solid-State Phase Transformation of Form  $\beta$  to  $\gamma$  of Sulfanilamide Using Time-Resolved Energy-Dispersive X-ray Diffraction.* : Chemistry of Materials, 1996, Zv. 8, str. 1042-1051.
55. **S. Toscani**, *An up-to-date approach to drug polymorphism.* : Thermochimica Acta, 1998, Zv. 321, str. 73-79.
56. **X. Wang et al.**, *Quasi-Emulsion Precipitation of Pharmaceuticals. 2. Application to Control of Polymorphism.* : Crystal Growth & Design, 2006, Zv. 6, str. 2228-2240.
57. **R. Blinc et al.**,  *$^{14}N$  nuclear quadrupole resonance of some sulfa drugs.* : Solid State Nuclear Magnetic Resonance, 2006, Zv. 30, str. 61-68.
58. **A. Portieri et al.**, *Effects of polymorphic differences for sulfanilamide, as seen through  $^{13}C$  and  $^{15}N$  solid-state NMR, together with shielding calculations.* : Magnetic Resonance in Chemistry, 2004, Zv. 42, str. 313-320.
59. **F. Vrečer et al.**, *Characterization of piroxicam crystal modifications.* : International Journal of Pharmaceutics, 2003, Zv. 256, str. 3-15.
60. **A. R. Sheth et al.**, *Polymorphism in piroxicam.* : Crystal Growth & Design, 2004, Zv. 4, str. 1091-1098.

61. **A. R. Sheth et al.**, *Dehydration Kinetics of Piroxicam Monohydrate and Relationship to Lattice Energy and Structure*. : Journal of Pharmaceutical Sciences, 2004, Zv. 93, str. 3013-3026.
62. **A. R. Sheth et al.**, *Mechanochromism of Piroxicam Accompanied by Intermolecular Proton Transfer Probed by Spectroscopic Methods and Solid-Phase Changes*. : Journal of the American Chemical Society, 2005, Zv. 127, str. 6641-6651.
63. **T. Eckert et al.**, *Über polymorphe Modifikationen des Nifedipine aus unterkuhlten Schmelzen*. : Archiv der Pharmazie, 1976, Zv. 310, str. 116-118.
64. **B. Keymolen et al.**, *Investigation of the polymorphic transformations from glassy nifedipine*. : Thermochimica Acta, 2003, Zv. 397, str. 103-117.
65. **D. Grooff et al.**, *Thermal methods for evaluating polymorphic transitions in nifedipine*. : Thermochimica Acta, 2007, Zv. 454, str. 33-42.
66. **K. L. A. Chan et al.**, *Polymorphism and devitrification of nifedipine under controlled humidity: a combined FT-Raman, IR and Raman microscopic investigation*. : Journal of Raman Spectroscopy, 2004, Zv. 35, str. 353-359.
67. **A. Burger et al.**, *Polymorphism and pseudopolymorphism on nifedipine*. : Scientia Pharmaceutica, 1996, Zv. 64, str. 293-301.
68. **Y. Aso et al.**, *The physical stability of amorphous nifedipine determined by isothermal microcalorimetry*. : Chemical and Pharmaceutical Bulletin, 1995, Zv. 43, str. 300-303.
69. **P. J. Marsac et al.**, *A Comparison of the Physical Stability of Amorphous Felodipine and Nifedipine Systems*. : Pharmaceutical Research, 2006, Zv. 23, str. 2306-2316.
70. **C. Bhugra et al.**, *Role of Mechanical Stress in Crystallization and Relaxation Behavior of Amorphous Indomethacin*. : Journal of Pharmaceutical Sciences, 2008, Zv. 97, str. 4446-4458.
71. **T. Miyazaki et al.**, *Crystallization rate of amorphous nifedipine analogues unrelated to the glass transition temperature*. : International Journal of Pharmaceutics, 2007, Zv. 336, str. 191-195.

72. **Y. Aso et al.**, *Relationship Between the Crystallization Rates of Amorphous Nifedipine, Phenobarbital, and Flopropione, and Their Molecular Mobility as Measured by Their Enthalpy Relaxation and  $^1H$  NMR Relaxation Times.* : Journal of Pharmaceutical Sciences, 2000, Zv. 89, str. 408-416.
73. **Y. Aso et al.**, *Explanation of the Crystallization Rate of Amorphous Nifedipine and Phenobarbital from Their Molecular Mobility as Measured by  $^{13}C$  Nuclear Magnetic Resonance Relaxation Time and the Relaxation Time Obtained from the Heating Rate Dependence of the Tg.* : Journal of Pharmaceutical Sciences, 2001, Zv. 90, str. 798-806.
74. **Y. Aso et al.**, *Molecular Mobility-Based Estimation of the Crystallization Rates of Amorphous Nifedipine and Phenobarbital in Poly(vinylpyrrolidone) Solid Dispersions.* : Journal of Pharmaceutical Sciences, 2004, Zv. 93, str. 384-391.
75. **F. Hirayama et al.**, *2-Hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin on Crystallization and Polymorphic Transition of Nifedipine in Solid State.* : Pharmaceutical Research, 1994, Zv. 11, str. 1766-1770.
76. **H. Ishida et al.**, *Sudden Rise of Crystal Growth Rate of Nifedipine near Tg without and with Polyvinylpyrrolidone.* : Journal of Pharmaceutical Sciences, 2007, Zv. 96, str. 1131-1138.
77. **D. C. Aupperley et al.**, *Characterisation of indomethacin and nifedipine using variable-temperature solid-state NMR.* : Magnetic Resonance in Chemistry, 2005, Zv. 43, str. 881-892.
78. **Y. Aso et al.**, *Feasibility of using isothermal microcalorimetry to evaluate the physical stability of amorphous nifedipine and phenobarbital.* : Thermochimica Acta, 2001, Zv. 380, str. 199-204.
79. **D. Zhou et al.**, *A Calorimetric Investigation of Thermodynamic and Molecular Mobility Contributions to the Physical Stability of Two Pharmaceutical Glasses.* : Journal of Pharmaceutical Sciences, 2007, Zv. 96, str. 71-83.
80. **N. Rodriguez-Hornedo et al.**, *Significance of Controlling Crystallization Mechanisms and Kinetics in Pharmaceutical Systems.* : Journal of Pharmaceutical Sciences, 1999, Zv. 88, str. 651-660.

81. **J. Tao et al.**, *Kinetics of Cross-Nucleation between Polymorphs*. : The Journal of Physical Chemistry, 2006, Zv. 110, str. 7098-7101.
82. **M. Kitamura**, *Controlling Factors and Mechanism of Polymorphic Crystallization*. : Crystal Growth & Design, 2004, Zv. 4, str. 1153-1159.
83. **J. O. Smith**, *Mathematics of the Discrete Fourier Transform (DFT) Second edition*. Stanford : W3K Publishing, 2007.
84. <http://mathworld.wolfram.com/ApodizationFunction.html> (E. W. Weisstein, *Apodization Function*., MathWorld., Wolfram Research Inc., 2009)