

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

NERMINA HUSEJNOVIĆ

MAGISTRSKA NALOGA

ENOVITI MAGISTRSKI ŠTUDIJ FARMACIJE

Ljubljana, 2016

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

NERMINA HUSEJNOVIĆ

**DOLOČANJE VSEBNOSTI METOKSI IN HIDROKSIPROPOKSI
SKUPIN V RAZLIČNIH TIPIH HIPROMELOZE S KVANTITATIVNO
PROTONSKO JEDRSKO MAGNETNO RESONANČNO
SPEKTROSKOPIOJO**

**DETERMINATION OF HYDROXY AND HYDROXYPROPOXY
GROUPS IN DIFFERENT TYPES OF HYPMELLOSE WITH
QUANTITATIVE PROTON NUCLEAR MAGNETIC RESONANCE
NMR SPECTROSCOPY**

Ljubljana, 2016

Magistrsko naložko sem opravljala na Fakulteti za farmacijo pod mentorstvom doc. dr. Jožka Cesarja, mag. farm.

Mentorju doc. dr. Jožku Cesarju se zahvaljujem za potrpežljivost, pomoč in nasvete pri eksperimentalnem delu in izdelavi magistrske naloge. Zahvaljujem se vsem zaposlenim na katedri, ki so v kakršnikoli obliki prispevali k nastanku magistrskega dela.

Posebna zahvala mojim staršem in sestri, ki so moj največji navdih, podpora in spodbuda.

IZJAVA

Izjavljam, da sem magistrsko naložko samostojno izdelala pod mentorstvom doc. dr. Jožka Cesarja, mag. farm.

Nermina Husejnović

POVZETEK

Hidroksipropilmetyl celuloza (HPMC, hipromeloza) je eden najpogosteje uporabljenih polimerov v sodobni farmacevtski industriji. Zaradi varnosti, netoksičnosti, stabilnosti v širokem pH področju in cenovne ugodnosti. Zaradi njegove razširjene uporabnosti je zelo pomembno, da so analizne metode, s katerimi dokazujemo kvalitativno in kvantitativno sestavo polimera natančne, točne, časovno ne predolge in eksperimentalno nezahtevne. V magistrski nalogi smo proučevali in optimizirali kvantitativni način določanja HPMC z metodo ^1H NMR.

V prvem delu eksperimentalnega dela smo najprej določili najprimernejše topilo, v katerem smo raztopili preiskovane vzorce in posneli meritve. Kot topila smo preizkušali DMSO, devterirano vodo ter devterirana aceton in metanol. Uporabljeni vzorci so se med seboj razlikovali po deležu metoksi in hidroksipropoksi skupin. Na podlagi rezultatov spektrov smo ugotovili, da kot topili najbolje ustreza DMSO in devterirana voda. V prvem koraku izvedbe smo uporabljali DMSO, v drugem delu eksperimentalnega dela smo kot topilo vzeli devterirano vodo, ker spektri vzorcev posnetih v DMSO-ju niso bili jasni in niso dajali pričakovanih rezultatov.

Nato smo določili optimalno koncentracijsko območje, v katerem se bodo vzorci raztopili v izbranem topilu brez dodatnih metod raztavljanja vzorca. Dokazali smo, da je optimalna koncentracija, pri kateri dobimo jasne in dobro ločene pike, pri 20 mg/ml. Zaradi pojava geliranja hipromeloze pri povišani temperaturi, smo po določitvi ustreznega topila in koncentracije morali določili optimalno temperaturo, pri kateri nam vzorci ne bodo gelirali in bomo dobili primerljive rezultate. Spektre smo posneli pri temperaturah 20 °C, 40 °C in 60 °C. Na podlagi spektrov smo se odločili, da bom snemali vzorce pri temperaturi 40 °C. Pri visokotemperurni izvedbi smo opazili, da je vzorec, potem ko smo ga vzeli iz aparature, geliral in posledično tudi spektri niso bili primerni za nadaljnjo obdelavo.

V drugem delu eksperimentalnega dela smo posneli vzorce z različno stopnjo deleža metoksi in HP (hidroksipropoksi) skupin. Opazovali smo površino pikov in njihovo razliko glede na stopnjo substitucije. Spektre smo posneli z metodo ^1H NMR. Poskušali smo posneti tudi spektre ^{13}C NMR, ampak nismo uspeli določiti pogojev za snemanje vzorca, ki bi nam dali primerljive spektre.

Spektre smo posneli z vzorci različnih stopenj substitucije, pri različnih temperaturah, topilih in koncentracijah. Nismo uspeli ugotoviti, kateri so ustrezni pogoji, s katerim bi lahko na koncu dobili spekter, ki bi nam dal zahtevane rezultate. Zato tudi nismo uspeli narediti dvodimensionalnega spektra $^1\text{H} - ^{13}\text{C}$ HSQC, uspelo nam je narediti le spekter $^1\text{H} - ^1\text{H}$ COSY.

V zadnjem delu smo še enkrat posneli vse vzorce, ter določili razmerje med površino vsakega posameznega pika in površino pika, ki predstavlja hidroksipropoksi skupino.

ABSTRACT

Hydroxypropyl methylcellulose (HPMC, hypromellose) is one of the most used polymers in the modern pharmaceutical industry. It is safe, not toxic, and stable in wide pH – spectrum and it is not expensive. Because it is so widely used, it is important that the analytical methods used for quantitative and qualitative experiments are accurate, not time consuming and are experimental way of determination HPMC with ^1H NMR method. In the thesis we studied and tried to optimize the quantitative method of determining the HPMC by ^1H NMR method.

In the first part of experimental work we tried to determinate which solvent is the most accurate for solving our tests substances and measuring their concentration. DMSO, D_2O , Acetones – $\text{d}6$ und MeOD were used as solvents. The difference between the used test substances was in part of methoxy and part of hydroxypropoxy groups. According to the results from the specters, the most suitable solvents were DMSO and D_2O . firstly we used, but in the second part of the experimental work we took D_2O as solvent, because specters made with DMSO were not clear and did not give us the results we wanted. As next we determinated the concentration, which we will be using for solving our substances, without using other methods for dissolution. We proved that the concentration where we get clear and separated peaks is 20 mg/ml. Because HPMC starts to gels with higher temperatures, we had to determinate the accurate temperature for measurement, where our substances will not start to gel and we will get good results. We made specters at temperatures 20 °C, 40 °C and 60 °C. At higher temperatures we saw that our substance started to gel, after we took it from apparatus and therefore the specters we get were not good for our work.

In the second part of our experimental work we made specters of our test substances with different part of methoxy and hydroxypropoxy groups. We observed the area under the peaks and their difference regards to their degree of substitution. We made specters with ^1H NMR method. We also tried to make ^{13}C NMR specters, but we did not succeed in finding the right conditions for measurement, which would give us good specters. We tried in making specters of test substances with different degree of substitution, with different T and concentration.

Butt still, we could not find the right conditions to make a measurement which would give us a specter with the information we wanted. That is the reason why we did not succeed to make 2D $^1\text{H} - ^{13}\text{C}$ HSQC specter, but we succeed in making $^1\text{H} - ^1\text{H}$ COSY specter.

In the last part of the experimental work, we made specters of our test substances, all again. Then we determinate the relation of areas between areas of single one peaks and the area of hydroxypropoxy peak.

KAZALO

IZJAVA	III
POVZETEK	IV
ABSTRACT	VI
KAZALO	X
KAZALO SLIK	XI
KAZALO PREGLEDNIC	XI
SEZNAM OKRAJŠAV	XI
1 POGLAVJE	1
UVOD	1
1.1 HIPROMELOZA ALI HIDROKSIPROPILMETIL CELULOZA.....	1
1.2 METODE VREDNOTENJA HIPROMELOZE	4
1.2.1 DOLOČANJE DELEŽA METOKSI IN HIDROKSIPROPOKSI SKUPIN S PLINSKO KROMATOGRAFIJO	4
1.2.2 OSTALE METODE PREISKOVANJA HIPROMELOZE.....	5
1.3 JEDRSKA MAGNETNA RESONANCA	6
1.3.1 KVANTITATIVNA NMR METODA.....	8
1.3.2 UPORABA KVANTITATIVNE NMR ZA VREDNOTENJE POLIMEROV.....	9
2 POGLAVJE	11
NAMEN DELA	11
3 POGLAVJE	13
EKSPERIMENTALNO DELO	13
3.1 NAPRAVE IN DRUGI LABORATORIJSKI PRIBOR.....	13
3.2 REAGENTI	14
3.3 POSTOPKI	14
3.3.1 POSTOPEK DOLOČANJA USTREZNE KONCENTRACIJE.....	14
3.3.2 POSTOPEK DOLOČANJA USTREZNEGA TOPILA	14
3.3.3 POSTOPEK DOLOČANJA USTREZNE TEMPERATURE	15
3.3.4 POSTOPEK RAZTAPLJANJA VZORCA V ULTRAZVOČNI KADIČKI IN STRESALNIKU.....	15
3.3.5 POSTOPEK PRIPRAVE VZORCEV Z UPORABO FILTROV ALI BREZ NJIHOVE UPORABE.....	15
4 POGLAVJE	19
REZULTATI IN REZPRAVA	19
4.1 KVALITATIVNO VREDNOTENJE SPEKTROV	19
4.2 IZBIRA USTREZNEGA TOPILA IN POGOJEV SNEMANJA	26
4.2.1 IZBIRA USTREZNEGA TOPILA	26
4.2.2 VPLIV TEMPERATURE VZORCA	28
4.2.3. VPLIV ROTACIJE	29
4.2.4. ASIGNACIJA POSAMEZNIH SIGNALOV	30
4.2.5 STANDARDIRIZIRANI POGOJI IN OBDELAVA SPEKTROV	33
4.2.6 PROCESIRANJE SPEKTROV	34
4.3 DELEŽ METOKSI IN HIDROKSIPROPOKSI SKUPIN	37

5 POGLAVJE	39
SKLEP	39
6 POGLAVJE	41
LITERATURA	41

KAZALO SLIK

SLIKA 1: Struktura formula hipromeloze (5).....	2
SLIKA 2: Zgradba NMR spektrometra (10).....	6
SLIKA 3: Ponazoritev procesiranja atomskega jedra v zunanjem magnetnem polju (10).....	7
SLIKA 4: Energijski prehod atomskega jedra iz osnovnega v vzbujeno energijsko stanje (10).	8
SLIKA 5: Aparat NMR na Fakulteti za farmacijo (UL) (16).....	13
SLIKA 6: Primerjava spektrov najbolj viskoznega vzorca posnetih pri 20 °C v DMSO (spodaj) in D ₂ O (zgoraj).....	16
SLIKA 7: Primerjava spektrov najbolj viskoznega vzorca posnetih pri 40 °C v DMSO (spodaj) in D ₂ O (zgoraj).....	17
SLIKA 8: Primerjava spektrov najbolj viskoznega vzorca posnetih pri 60 °C v DMSO (spodaj) in D ₂ O (zgoraj).....	18
SLIKA 9: Spekter Methocela 2910.	19
SLIKA 10: Spekter Methocela 2910.	20
SLIKA 11: Spekter Methocela 2910.	21
SLIKA 12: Spektra Methocela 2208.	22
SLIKA 13: Spektra Methocela 2208.	23
SLIKA 14: Spektra Methocela 2910.	24
SLIKA 15: Spekter Methocela 2910.	25
SLIKA 16: Primerjava spektrov Methocela F50 raztopljenega v DMSO (zgoraj) in D ₂ O (spodaj).	26
SLIKA 17: NMR spekter vzorca Methocela F50 v MeOD (zgoraj) in vzorca Methocela 50/50 v zmesi MeOD in CDCl ₃ (spodaj).....	27
SLIKA 18: NMR spektri Methocela F50 posnetih pri različnih temperaturah.	28
SLIKA 19: NMR spektra vzorca Methocel K15M posneta s spinom (spodaj) in brez spina (zgoraj)....	29
SLIKA 20: ¹³ C spekter vzorca HPMC F50 v DMSO.....	30
SLIKA 21: HSQC spekter vzorca Methocel F50 v DMSO.	31
SLIKA 22: COSY spekter Methocela E50.	32
SLIKA 23: Asignacija signalov vzorca Methocela E50, na podlagi COSY spektra in literature.	33
SLIKA 24: Primerjava spektrov istega vzorca obdelave.	34
SLIKA 25: Spekter Methocela F50.....	35
SLIKA 26: Primerjava spektrov z različno stopnjo viskoznosti.	XXXVI

KAZALO PREGLEDNIC

PREGLEDNICA 1: Delitev hipromeloze glede na stopnjo substitucijske stranske verige po USP in evropski farmakopeji. Farmakopeji sta harmonizirani (3).	2
PREGLEDNICA 2: DS za različne stopnje hipromeloze Methocel® proizvajalca The Dow Chemical Company (3).	4
PREGLEDNICA 3: Karakterizacija uporabljenih naprav.	13

PREGLEDNICA 4: Uporabljeni reagenti.	14
PREGLEDNICA 5: Standardizirani pogoji za snemanje ^1H NMR spektrov (20).	34

SEZNAM OKRAJŠAV

2D	Dvodimenzionalen
C	Koncentracija
CE	Celulozni etri
COSY	Correlation Spectroscopy
DMSO	Dimetilsulfoksid
DP	Stopnja polimerizacije (<i>ang. Degree of Polymerization</i>)
DS	Stopnja substitucije (<i>ang. Degree of Substitution</i>)
FDA	Food and Drug Administration
FID	Free Induction Decay
GC	Plinska kromatografija (<i>ang. Gas Cromatography</i>)
GRAS	Generally Recognized as Safe
HPMC	Hidroksipropilmetyl celuloza (hipromeloza, Methocel, Goniosol)
MF	Mobilna faza
qNMR	Kvantitativna jedrska magnetna resonanca
USP	Ameriška farmakopeja (<i>ang. U.S. Pharmacopeial Convention</i>)

1 POGlavje

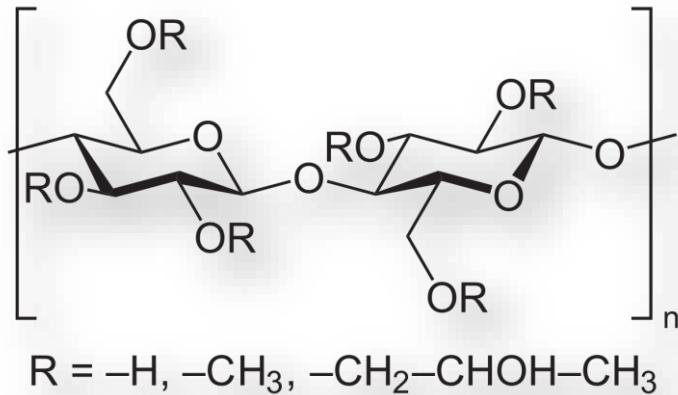
UVOD

1.1 HIPROMELOZA ALI HIDROKSIPROPILMETIL CELULOZA

Hipromeloza je uradno, nelašniško ime za hidroksilpropilmetyl celulozo. V evropski farmakopeji 8.1. je definirana kot delno O-metilirana in O-(2- hidroksipropilirana) celuloza (Slika 1), ki lahko vsebuje do 0,6 % SiO₂ (2). Hidroksipropilmetyl celuloza je bel prah brez vonja, sposoben je vezati vodo, deluje kot zgoščevalo, emulgator, vezivo ali stabilizator (1). Njena topnost je funkcija viskoznosti polimera - nižja viskoznost je sorazmerna z višjo topnostjo. V hladni vodi je celuloza netopna zaradi svoje semi-kristalne strukture. Segrevanje vodne raztopine celuloze vodi do nabrekanja in prekinitve kristalne strukture. Z naraščanjem temperature se povečuje nabrekanje in hkrati narašča viskoznost celuloze. Ta pomembna lastnost je razlog, zakaj jo uporabljam v živilski industriji kot zgoščevalo. Druga pomembna fizikalna lastnost, ki jo izkoriščajo v industriji, je retrogradacija (4). Po znižanju temperature se verige polimerov povrnejo nazaj v prvotno-urejeno stanje. V acetonu, toluenu in brezvodnem etanolu je hipromeloza netopna. Topi se v vodi, v mešanicah etanol/voda in propanol/voda. Spada med neionske, inertne, viskoelastične in hidrofilne celulozne etre. Na trgu je v uporabi že več kot 50 let, ima status spojine GRAS (*angl. Generally Recognized As Safe, FDA*) in monografijo v vseh svetovnih farmakopejah. Je mešan CE (celulozni eter), pri katerem so hidroksilne skupine na osnovni enoti glukoze (na mestih 2, 3 in 6) delno O-metilirane in O-(2-hidroksipropilirane). Preračunano na suho maso snovi lahko hipromeloza vsebuje od 19 % do 30 % metoksi skupin (—OCH₃) in od 3 % do 12 % hidroksipropoksi skupin (OCH₂CHOHCH₃) (3).

Posamezni tipi hipromeloze se med seboj razlikujejo po stopnji substitucije. Vsaka serija HPMC-ja ima drugačen DS (*ang. Degree of substitution*), ki predstavlja delež metoksi in hidroksipropoksi skupin. Glede na viskoznost polimera ali njegovo molekulsko maso je spekter uporabe HPMC-ja širok. V živilski industriji se uporablja kot zgoščevalo in alternativa živalski želatini. V kozmetični industriji je pomemben dodatek šamponom, emulzijam, losjonom, milom in zobnim pastam, saj deluje kot zgoščevalo in stabilizator. V farmaciji ga uporabljam kot hidrofilni nosilec za pripravo farmacevtskih oblik s prirejenim sproščanjem. Njegova

najpomembnejša lastnost je visoka sposobnost nabrekanja. O stiku z vodnim medijem, na površini farmacevtske oblike pride do nastanke gela, ki predstavlja bariero med medijem in preostankom zdravila(4).



SLIKA 1: Strukturna formula hipromeloze (5).

Za farmacevtsko industrijo so najbolje pomembne hipromeloze z DS med 1 in 2. V USP (ang. U.S. Pharmacopeial Convention) in v evropski farmakopeji so navedeni 4 tipi, ki jih definiramo glede na delež metoksi in hidroksipropoksi skupin (Preglednica 1) (3).

PREGLEDNICA 1: Delitev hipromeloze glede na stopnjo substitucijske stranske verige po USP in evropski farmakopeji. Farmakopeji sta harmonizirani (3).

Tip substitucije	Delež metoksi skupin (%)		Delež hidroksipropoksi skupin (%)	
	Najmanj	Največ	Najmanj	Največ
1828	16,5	20,0	23,0	32,0
2208	19,0	24,0	4,0	1,0
2906	27,0	30,0	4,0	7,5
2910	28,0	30,0	7,0	12,0

Prvi dve številki v oznaki tipa substitucije pomenita delež metoksi skupin, naslednji dve številki pa predstavljata delež hidroksipropoksi skupin, preračunanih na suho snov. S stopnjo substitucije izražamo povprečen odstotek metilnih ali hidroksipropoksi skupin v celulozi, ki so se zamenjale z vodikovimi protoni iz hidroksilnih skupin vezanih na celulozne enote.

Na monomerni enoti polimera so lahko prisotne največ 3 enote hidroksilnih skupin, zato ima DS vrednost samo med 0 in 3. Posamezen substitucijski tip polimera ima lahko več polimerov z različno molekulsko maso in viskoznostjo 2-odstotne vodne raztopine hipromeloze pri 60 °C po USP. Enota, v kateri merimo viskoznost, je mPa×s (3).

Kemijsko je hipromeloza sestavljena iz osnovnih glukoznih enot, ki so med seboj povezane z β -1,4glikozidno vezjo (4). Hidroksipropilmetyl celulozo pridobivamo z obdelavo celulozne pulpe, ki jo pridobivamo iz bombaža ali lesa. Pridobivamo jo tako, da celulozo pustimo nabrekati v vodni raztopini NaOH. V temperaturnem območju od 50 °C do 80 °C tvorimo etre s propilenoksidom in metilkloridom, slednji reagira samo pri povisani temperaturi. Značilni stranski produkti, ki nastajajo pri sintezi, so metanol, mono-, di- in tripropilenglikolni metilni etri propilenglikolov. Po sintezi sledi izolacija, kjer najprej pri temperaturi 110 °C oddestiliramo hlapne primesi. Produkt nato speremo z vročo vodo, s čimer odstranimo preostale glikole in soli (3).

Fizikalno-kemijske lastnosti so odvisne od molekulske mase polimera in razmerja med hidroksipropilno in metilno substitucijo. Razmerje med hidroksipropoksi in metilno substitucijo določa topnost polimera v organskih topilih in temperaturo geliranja v vodnih raztopinah. Razlika med HPMC, ki so na tržišču, je v stopnji polimerizacije (*angl.* DP-Degree Of Polymerisation) in stopnji substitucije (*angl.* DS-Degree Of Substitution). DS pomeni masni delež substituiranih skupin, ki so vezane na glukozni obroč. Nižja DS posledično pomeni slabšo topnost (2).

Oznake Methocel E, F, K in J pomenijo različne vrste hipromeloze s karakterističnimi lastnostmi (Preglednica 2).

PREGLEDNICA 2: DS za različne stopnje hipromeloze Methocel® proizvajalca The Dow Chemical Company (3).

Stopnja	DS metoksi	% Metoksi skupin	Hidroksipropoksi molarna substitucija	% Hidroksipropoksi skupin
E	1.9	29	0.23	8.5
K	1.4	22	0.21	8.1
F	1.8	28	0.13	5.0
J	1.3	18	0.82	27

1.2 METODE VREDNOTENJA HIPROMELOZE

Zaradi odvisnosti sprememb v strukturi polimera je za farmacevtsko tehnologijo izjemnega pomena določanje deleža metoksi in hidroksipropoksi skupin, viskoznosti in molekulske mase. Te lastnosti določajo v kakšne namene bomo uporabljali hipromelozo. Spremembe v strukturi vplivajo pomembno na funkcionalne lastnosti, npr. sproščanje iz tablet, kadar HPMC služi kot hidrofilni matriks (5).

1.2.1 DOLOČANJE DELEŽA METOKSI IN HIDROKSIPROPOKSI SKUPIN S PLINSKO KROMATOGRAFIJO

Po evropski farmakopeji 8.1 je za kvantitativno določanje odstotka hidroksipropoksi in metoksi skupin v hipermelozi predpisana metoda plinske kromatografije. Trenutno je to edina standardna metoda za kvantitativno določanje.

Plinsko kromatografijo uporabljamo za ločevanje, izolacijo posameznih komponent iz mešanice in za kvantitativno analizo. Metoda temelji na ločevanju iskane komponente od stacionarne faze zaradi razlike v adsorpciji. Pri GC (*ang. Gas chromatography*) je mobilna faza v plinastem agregatnem stanju in prenaša komponente zmesi skozi stolpec kolone. Vzorec se mora pred vstopom v stolpec pretvoriti v plinasto agregatno stanje. Mobilna faza je nizke viskoznosti in zato jo lahko uporabljamo daljši čas (6).

Detekcija manjših količin plinov in par je enostavnejša in natančnejša kot določanje majhnih količin tekoče substance. Metoda je najprimernejša za analiziranje hlapnih ($Mr < 500$), ne preveč polarnih snovi, ker se te predolgo zadržujejo na koloni in termično stabilnih snovi. Delovna temperatura kolone je od -70 °C do 400 °C. Za analizo potrebujemo hlapne analite, zato je posledično potrebna derivatizacija ali kemijska pretvorba v hlapne analite.

Podoben postopek za določanje deleža alkoksi in 2-hidroksipropoksi skupin v hipromelozi, uporabljam se danes, le da za kvantitativno vrednotenje uporabljam plinsko kromatografijo. Metode temelji na kvantitativni pretvorbi metilnih in 2-hidroksipropilnih etrskih skupin v metil jodid in izopropil jodid. Po postopku, kot je opisan v Ph. Eur., HPMC natehtamo v vialo, dodamo adipinsko kislino (katalizator), raztopino internega standarda (oktan v ksilenu) ter jodovodikovo kislino (HI). Vialo nato neprodušno zatesnimo in segrevamo 1 uro pri 130 °C. reakcijsko zmes nato ohladimo in določimo količino nastalega metil jodida in izopropil jodida v primerjavi z raztopino standarda (6).

Pomanjkljivosti opisane metode so, da zahteva uporabo agresivnih in toksичnih reagentov (HI, metil jodid, izopropil jodid), postopek je časovno potraten, točnost in ponovljivost pa sta relativno slabi (7).

1.2.2 OSTALE METODE PREISKOVANJA HIPROMELOZE

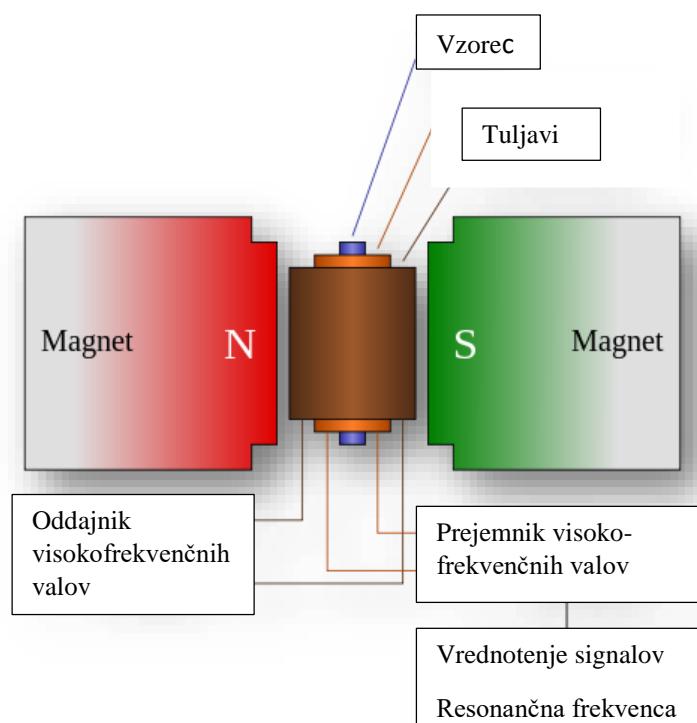
Hipromelozo lahko določamo tudi z drugimi analiznimi metodami, ki niso določene po farmakopeji. V uporabi so gelska HPLC (ang. High-performance liquid chromatography) za določanje vsebnosti hipromeloze. To metodo pogosto uporabljam v farmacevtski tehnologiji pri kvantitativni analizi količine hipromeloze v tabletah s prirejenim sporočanjem. Uporablja se tudi gelsko izključitvena kromatografija. Z njo ugotavlja delež hipromeloze v farmacevtskih oblikah za oči (6). Reološke lastnosti vodnih raztopin hipromeloze so odvisne od molekulske mase polimera, koncentracije polimera, temperature in prisotnosti drugih topljencev v preiskovani zmesi. Viskoznost vodne raztopine hipromeloze je konstantna pri zelo nizkih strižnih hitrostih. To pomeni, da se pri nižjih strižnih hitrostih vodne raztopine hipromeloze obnašajo newtonsko kot idealne raztopine. Polimerna raztopina manjše koncentracije in iz polimera manjše molekulske mase se obnaša newtonsko (8).

1.3 JEDRSKA MAGNETNA RESONANCA

Z odkrivanjem novih vrst celuloznih etrov so posledično prišle tudi nove možnosti kontrol kakovosti teh polimerov. Novo odkrite vrste CE so zahtevale izboljšane in naprednejše analizne metode za določanje DS polimera in karakterizacijo substitucije polimera.

Jedrska magnetna resonanca (NMR) je fizikalni pojav, s katerim označujemo interakcije magnetnih momentov atomskih jader z elektromagnetnim poljem, s frekvenco enako lastni frekvenci. Posredno merimo magnetne lastnosti preiskovanega vzorca preko absorbiranega ali izsevanega elektromagnetnega valovanja. Pri tehniki NMR spremljamo jedra, katerih magnetni moment ni enak nič. Najpogosteje opazujemo ^1H , ^{13}C , ^{15}N , ^{31}P in ^{19}F (9).

Vzorec, ki ga najprej postavimo v zunanje magnetno polje, obsevamo z radijskimi valovi (Slika 2). Pri tem pride do porazdelitve jader. Pri določeni frekvenci atomska jedra absorbirajo prejeto valovanje in preidejo v vzbujeno stanje. Po določenem času se vračajo v osnovno stanje, pri tem pride do izsevanja elektromagnetnega valovanja, ki ga zaznamo s tuljavo. Resonančni pogoj je, da mora frekvenca oziroma energija ustrezati razlike energij med obema stanjem (9).



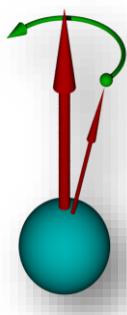
SLIKA 2: Zgradba NMR spektrometra (10).

Obnašanje atomskega jedra si razlagamo kot obnašanje nabito vrtečega se telesa v magnetnem polju. Delci in atomska jedra s spinom imajo kot rotirajoča se telesa svoj magnetni moment. Tega označimo z μ . Magnetni moment vrtečega se atomskega jedra v zunanjem magnetnem polju ne more zavzeti poljubne orientacije, ampak samo tiste, ki mu jih zakoni kvantne fizike dovoljujejo. Kadar pa se nahajajo v zunanjemu magnetnem polju pride do energijske razlike, temu pravimo Zeemanov učinek (9).

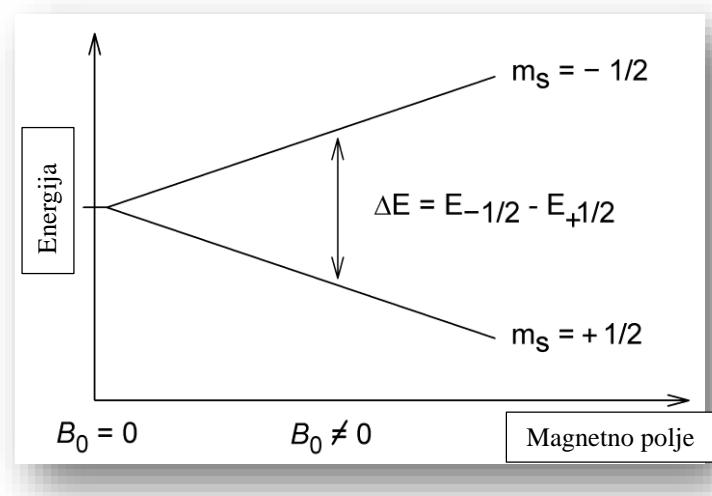
Zunanje magnetno polje, v katerem se nahajajo atomska jedra, povzroča navor na magnetni moment jedra in ga skuša obrniti v smer zunanjega polja. Jedro, ki se še vedno vrti, se ne obrne v smer zunanjega polja, ampak začne procesirati okrog zunanjega magnetnega polja z značilno Larmorjevo frekvenco (Slika 3). V primeru ${}^1\text{H}$ s spinom $\frac{1}{2}$ je lahko magnetni moment obrnjen v smeri zunanjega polja ali v nasprotni smeri. Energijska razlika med stanjem je odvisna od zunanjega magnetnega polja in giromagnetnega razmerja. B_0 je oznaka za jakost magnetnega polja, μ je oznaka za magnetni moment jedra (Enačba 1). Magnetizacija je vektorska vsota večjega števila magnetnih momentov, obrnjena je v smer zunanjega polja in velikost je premo sorazmerna gostoti magnetnega polja (9).

$$\Delta E = \frac{\gamma h B B_0}{2\pi} \quad \text{Enačba 1}$$

Ko skozi tuljavo, ki obdaja vzorec, steče tok, se v vzorcu pojavi izmenično magnetno polje, ki ga označimo z B_1 . Foton lahko reagira z jedrom in povzroči, da jedro absorbira ta foton in posledično zamenja orientacijo in preide iz osnovnega energijskega stanja v vzbujeno (Slika 4). Da do tega pride mora biti foton pravilno sučen in energija fotonov (B_1 (ki je premosorazmerna frekvenci valovanja) enaka energijski razliki med obema orientacijama magnetnega momenta jedra v magnetnem polju (9)).



SLIKA 3: Ponazoritev procesiranja atomskega jedra v zunanjem magnetnem polju (10).



SLIKA 4: Energijski prehod atomskega jedra iz osnovnega v vzbujeno energijsko stanje (10).

Vzorec ostane v vzbujenem stanju tudi po tem, ko prenehamo obsevati. Po določenem času se vrne v osnovno stanje in pri tem odda elektromagnetno valovanje, ki ima enako frekvenco kot signal, s katerim smo vzbujali atomska jedra. Ta proces imenujemo relaksacija, obstajata *longitudinalna ali spinsko–mrežna relaksacija in transverzalna relaksacija ali spinsko–spinska relaksacija*. Z longitudinalno relaksacijo opisujemo vračanje magnetizacije v ravnovesno stanje – smer zunanjega magnetnega polja, oziroma opišemo, kako hitro jedra z magnetnim dipolom oddajo prejeto energijo. Ta čas, ki ga potrebuje, imenujemo spinsko–mrežni relaksacijski čas (T_1). V praksi pada T_1 hitreje, kot smo to preračunali s spinsko–mrežno relaksacijo zaradi magnetnega polja drugih jeder. Temu pravimo spinsko – spinska relaksacija, času pa spinsko–spinski čas in označimo ga s T_2 . S to relaksacijo pojasnimo zmanjšanje pravokotne komponente magnetizacije (9).

1.3.1 KVANTITATIVNA NMR METODA

Kvantitativna metoda NMR je tudi absolutna metoda, torej lahko izvedemo kvantitativno analizo brez analiznih standardov preiskovane spojine. Kvantitativno določimo vsebnost analita skozi razmerje med integralom specifičnega vrha analita in integralom specifičnega standarda. Standard je lahko interni ali eksterni. V primeru, da imamo interni standard, ga dodamo direktno k preiskovanem vzorcu (11).

V primeru, da imamo eksterni standard, je ta koncentriran v kapilarni tubi. Poglavitna lastnost qNMR (*ang.* Quantitative nuclear magnetic resonance) je to, da je signal odziva (integrirana površina pod signalom) I_x v spektru, ki je prenosorazmeren številu jeder N_x . Prednost kvantitativne analize NMR je, da lahko dosežemo natančnost in točnost pod 1 % pri obdelavi signalov. Tako dosežemo primerljivost z drugimi analiznimi metodami (12).

Pri kvantitativni analizi z metodo NMR morajo biti zadoščeni določeni pogoji snemanja. Pri snemanju vzorcev z metodo NMR ne smemo pozabiti, da lahko isti vzorec izkazuje različne signale spektru v odvisnosti od pogojev. Ti so kompozicija vzorca, velikost tube NMR, volumen vzorca ter drugi eksperimentalni pogoji (13).

Pogoji, ki jim moramo zadostiti, da dosežemo kvantitativno metodo, so pulz 90° , čas zamika $5\chi T$, signali morajo biti ločeni na bazni liniji, snemati moramo spektre brez rotacije. Imeti moramo zadosten S/N (*ang.* Signal to noise ratio), ker nam to omogoči nižjo mejo detekcije in kvantifikacije. Na S/N lahko vplivamo tudi s spremenjanjem koncentracije vzorca in topila: maksimaliziramo koncentracijo vzorca in minimaliziramo koncentracijo topila, ter s tem posredno izboljšamo S/N (11).

Kvantitativni NMR kot analizno metodo uporabljam za določanje deleža nečistot in identifikacijo teh. Nastanek nefrakcioniranega heparina, ki je onečiščen z OSCP (*ang.* Oligomycin sensitivity conferring protein), je povzročil smrt več sto pacientov. Zato so se pri USP odločili omejiti vrednosti vsebnosti OSCP-ja in določili so tudi zgornje meje za vsebnost rezidualnih topil - devteriranega etanola in metanola. Nobena druga analizna metoda, HPLC ali GC, ne more določiti vsebnosti vseh nečistot in zato je trenutno edina primerna kvantitativna analiza NMR (14).

1.3.2 UPORABA KVANTITATIVNE NMR ZA VREDNOTENJE POLIMEROV

Je nedestruktivna metoda. V primerjavi s plinsko kromatografijo ni potrebno predhodno izolirati analita, kar posledično pomeni preprostejšo in hitrejšo pripravo vzorcev. V primeru, da preiskujemo večje CE, moramo uporabiti zelo razredčene raztopine s preiskovanim polimerom, ki pri preveliki koncentraciji gelira. Posledično pomeni to daljše *scan* čase (čas snemanja) in slabšo resolucijo spektrov. Ampak tudi ta problem lahko rešimo s predhodno acetilacijo, metilacijo ali hidrolizo polimera.

V evropski farmakopeji, monografija hidroksipropilbetadeksa, je uporabljena NMR kot analizna metoda za določanje stopnje substitucije preko molarne substitucije. Molarna substitucija je določena iz razmerja med signaloma, prvi signal predstavlja 3 protone metilnih skupin - ki so del hidroksipropilnih skupin, in drugi signal je proton, ki je vezan na glikozidni C₁ atom anhidrine enote glukoze. Stopnja substitucije je število hidroksipropilnih skupin v molekuli β -ciklodekstrina. Dobimo jo tako, da vrednost molarne substitucije pomnožimo s 7 (15).

2 POGLAVJE

NAMEN DELA

Preučevanje dostopnih virov o kvantitativni ^1H NMR analizi hidroksipropilmetil celuloze z različno stopnjo substitucije nam je pokazalo, da kljub velikem številu raziskav še vedno ni popolnoma jasno določeno, kateri so optimalni pogoji za pripravo vzorca, da dobimo primerljive spektre in kaj pomeni prisotnost določenih pikov v spektru.

V magistrski nalogi bomo skušali identificirati različne tipe hipromeloze. Poskušali bomo ugotoviti obstoj kvalitativnih razlik v spektrih in na podlagi česa jih lahko ločimo med seboj. Skušali bomo razviti kvantitativno metodo za določanje vsebnosti različnih tipov hipromeloze brez derivatizacije, segrevanja ali drugih metod. Ugotavliali bomo ali je metoda NMR primerna, za določanje posameznih skupin v HMPC, ne da bi vzorec predhodno morali derivatizirati.

Naše diplomsko delo bo razdeljeno v 4 segmente:

1. Optimizacija priprave vzorcev.

Izbrali bomo najprimernejše topilo, v katerem se bodo raztopili vzorci različnih tipov in viskoznosti, določili ustrezno koncentracijo vzorcev ter izbrali postopek raztopljanja glede na čas, temperaturo, stresanje, mešanje ali ultrazvočno obdelavo. Eno serijo vzorcev bomo filtrirali, ter primerjali dobljene rezultate z rezultati nefiltriranih vzorcev. Drugo serijo bomo skušali raztopiti v topilu s stresnikom in ultrazvokom. Nato bomo te rezultate primerjali z rezultati vzorcev raztopljenih v topilu brez stresnika in ultrazvoka.

2. Optimizacija pogojev snemanja in obdelave spektrov.

Izbrali oz. postavili bomo ustrezno pulzno sekvenco, ki zajema ekscitacijski pulz, mešalni čas, čas in frekvenco zajema signala ter čas zamika med dvema pulzoma, število pulzov, temperaturo snemanja in morebitno rotacijo vzorca. Osnovni FID signal bomo obdelali z različnimi funkcijami z namenom pridobivanja optimalne ločljivosti med posameznimi vrhovi ter čim večje razmerje med signalom in šumom za posamezen vrh.

3. Asignacija posameznih signalov.

Signale v spektrihih-¹H in ¹³C NMR bomo identificirali s pomočjo 2D korelacijskih spektrov, kot sta COSY in HSQC.

4. Postavitev kvantitativnega modela za vrednotenje vsebnosti metoksi in HP skupin.

Na podlagi površin vrhov, ki pripadajo posameznim protonom, bomo poizkusili postaviti model za vrednotenje vsebnosti metoksi in HP skupin ter ga nato validirati s pomočjo vzorcev z znano vsebnostjo metoksi in HP skupin, kot jih je s farmakopejsko metodo GC določil proizvajalec.

3 POGlavje

EKSPERIMENTALNO DELO

3.1 NAPRAVE IN DRUGI LABORATORIJSKI PRIBOR

Izvedba zastavljenih eksperimentov je zahtevala uporabo naprav naštetih v preglednici 3 kot tudi reagente iz preglednice 4.

PREGLEDNICA 3: Karakterizacija uporabljenih naprav.

Naprava	Proizvajalec
Spektrometer NMR (Slika 5)	BRUKER AVANCE III 400MHz, ZDA
Filtri 45µm	Sartorius, Nemčija
Programska oprema Mestrelab Research	Mnova, Španija
Tube NMR	Sigma Aldrich Noell, ZDA
Analitska tehnica	Mettler Toledo
Stresalnik	IKA, Kitajska
Ultrazvočna kadička	ISKRA pio, Slovenija



SLIKA 5: Aparat NMR na Fakulteti za farmacijo (UL) (16).

3.2 REAGENTI

PREGLEDNICA 4: Uporabljeni reagenti.

Reagent
DMSO
D ₂ O
Aceton –d6
MeOD

3.3 POSTOPKI

3.3.1 POSTOPEK DOLOČANJA USTREZNE KONCENTRACIJE

Pri iskanju ustrezne koncentracije smo najprej poskusili s koncentracijo 40 mg/ml. Nato smo ponovno posneli spektre istih vzorcev, pri manjši koncentraciji – 20 mg/ml. Glede na rezultate dobljenih spektrov smo za nadaljnje eksperimentalno delo vzeli manjšo koncentracijo vzorca. Ugotovili smo namreč, da je prekrivanje manjše pri manjši koncentraciji vzorca.

3.3.2 POSTOPEK DOLOČANJA USTREZNEGA TOPILA

Pri iskanju ustreznega topila smo izbirali med dimetilsulfoksidom (DMSO), devterirano vodo (D₂O), devteriranim acetonom (aceton-d6) in devteriranim metanolom (MeOD). V vseh topilih smo raztopili najbolj in najmanj viskozna vzorca. Koncentracija polimera je bila 40 mg/ml. Spektre smo nato posneli pri temperaturi 21 °C. Spektri so nam pokazali, da sta kot topili najustreznejša devterirana voda in DMSO. Spektri vzorcev raztopljenih v teh topilih so imeli jasno bazno linijo, vrhovi so bili jasno ločeni in določljivi. Pri acetonu – d6 in CDCl₃ je bilo na spektru vidno samo topilo in vzorec se sploh ni raztoplil. V spektru MeOD – se je vzorec raztoplil in videli smo vrhove. Nato smo pri izbiri med DMSO-jem in devterirano vodo spet uporabili polimera z najvišjo in najnižjo viskoznostjo, tokrat pri koncentraciji 20 mg/ml in spektre smo ponovno snemali pri temperaturi 21 °C. Izkazalo se je, da pri vzorcih raztopljenih v DMSO-ju dobimo spektre z manjšim medsebojnim prekrivanjem vrhov in boljšo ločljivostjo. Zato smo v prvem delu eksperimentalnega dela uporabljali DMSO. Pri snemanju kasnejših spektrov, vzorcev z različno stopnjo substitucije, nam spektri vzorcev raztopljenih v DMSO-ju niso več dajali ustreznih rezultatov, ki bi jih lahko uporabili pri naši raziskavi.

Bazna linija ni bila linearна, vrhovi so se prekrivali, niso bili jasno določljivi in bili so preširoki - razvlečeni. Zato smo raziskavo nadaljevali z devterirano vodo kot topilom.

3.3.3 POSTOPEK DOLOČANJA USTREZNE TEMPERATURE

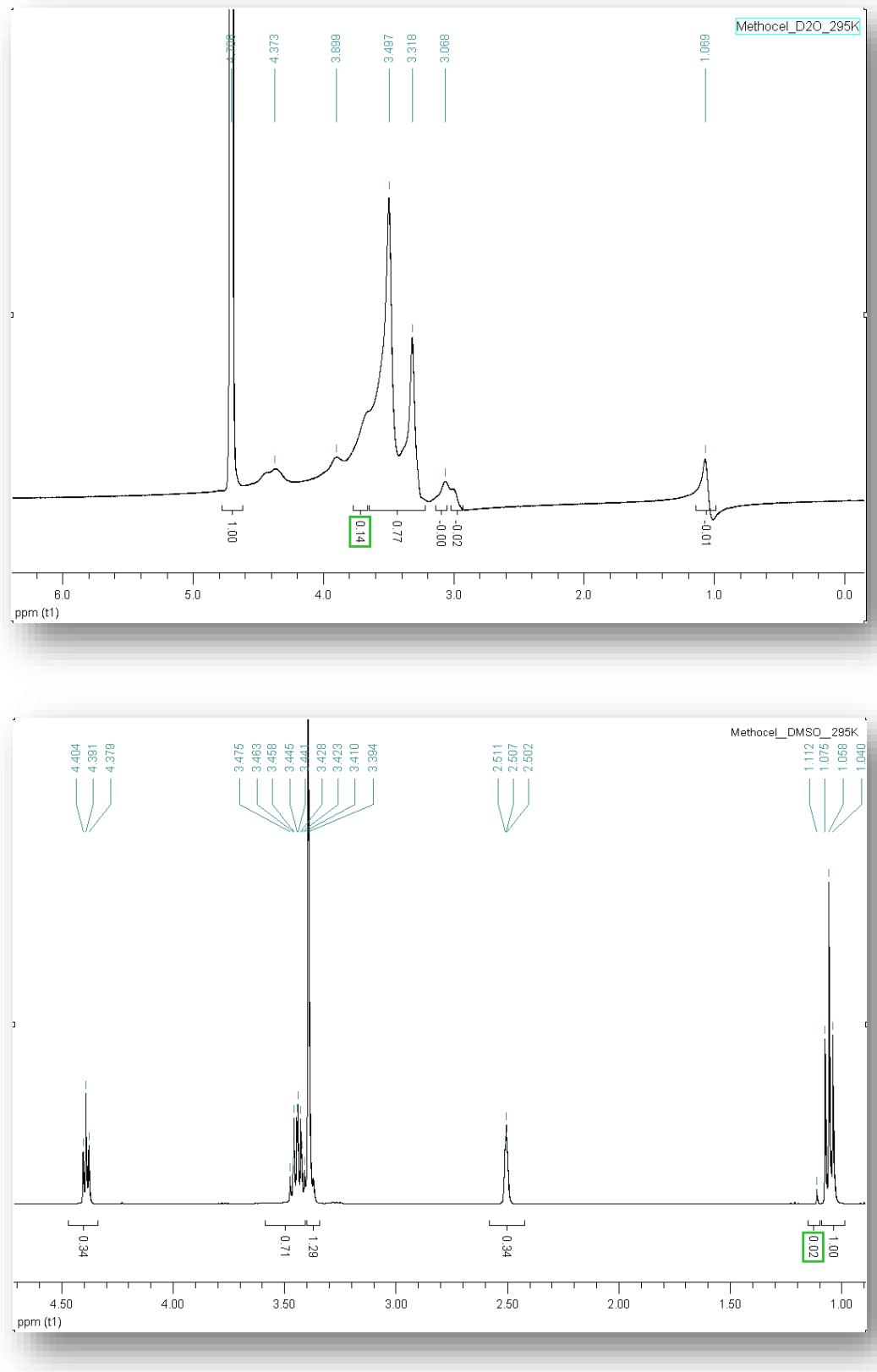
Tako kot pri določanju ustreznega topila smo tudi pri določanju ustrezne temperature za snemanje spektrov uporabili podobno tehniko. Vzeli smo vzorec z najvišjo viskoznostjo (Methocel 30272899). Tega smo raztopili najprej v DMSO-ju in nato v devterirani vodi pri koncentraciji 20 mg/ml. Spektre smo nato posneli pri temperaturah 20 °C, 40 °C in 60 °C. Spektri so pokazali, da je za nadaljnje raziskave najprimernejše delo pri temperaturi 40 °C (Slika 7). Vrhovi so bili jasno izraženi, niso bili razvlečeni in ni bilo prekrivanj. Pri najnižji temperaturi nismo imeli jasne bazne linije, vrhovi so bili razširjeni in med seboj so se prekrivali (Slika 6). Pri najvišji temperaturi smo opazili, da je prišlo do geliranja v tubi. Vrhovi so bili izraženi in ni bilo prekrivanj, a bili so preširoki (Slika 8).

3.3.4 POSTOPEK RAZTAPLJANJA VZORCA V ULTRAZVOČNI KADIČKI IN STRESALNIKU

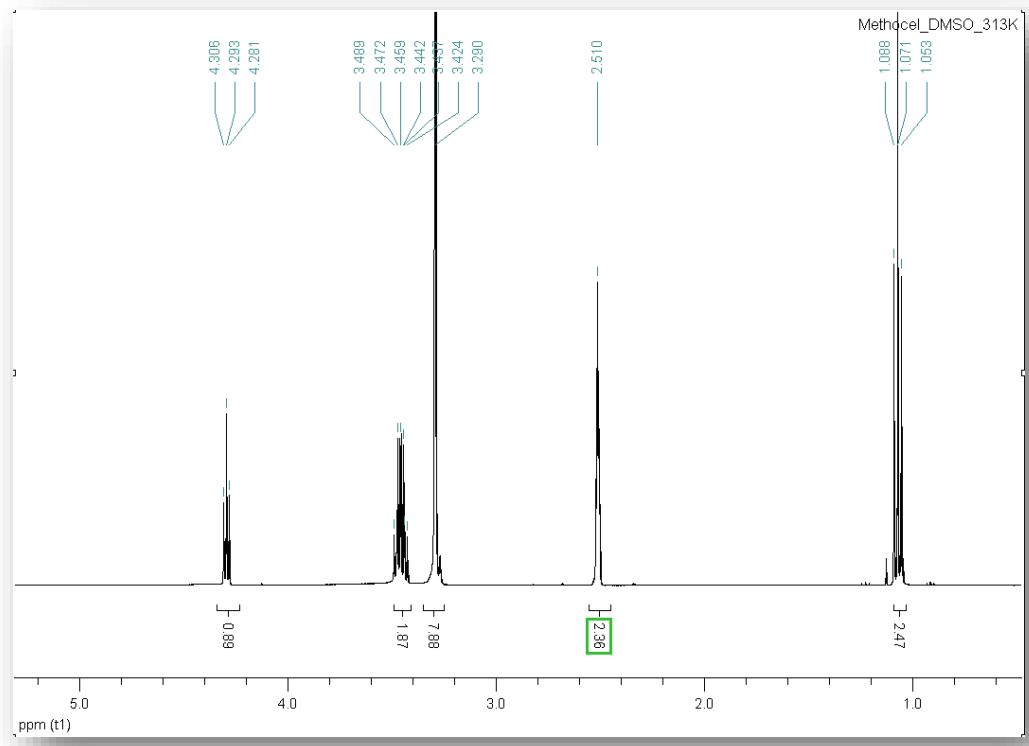
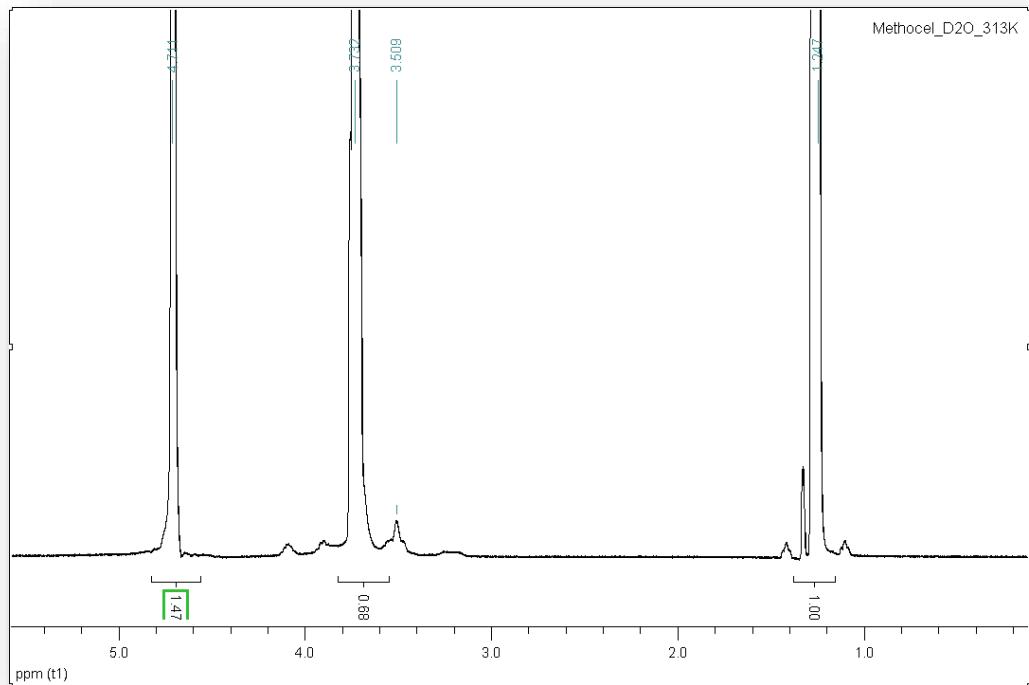
Pri najbolj viskoznih vzorcih je bilo raztpljanje na sobni temperaturi dolgotrajno. Zato smo te vzorce raztplljali s stresanjem na stresalniku. Vzorce smo pustili čez noč v bučkah na stresalniku in naslednji dan smo jih raztopljene prenesli v NMR tube. Eno serijo viskoznih analitov smo odločili raztopiti v ultrazvočni kadički. Velikih sprememb v rezultatih dobljenih spektrov ni bilo, tako da smo še naprej raztplljali vzorce s stresanjem na stresalniku.

3.3.5 POSTOPEK PRIPRAVE VZORCEV Z UPORABO FILTROV ALI BREZ NJIHOVE UPORABE

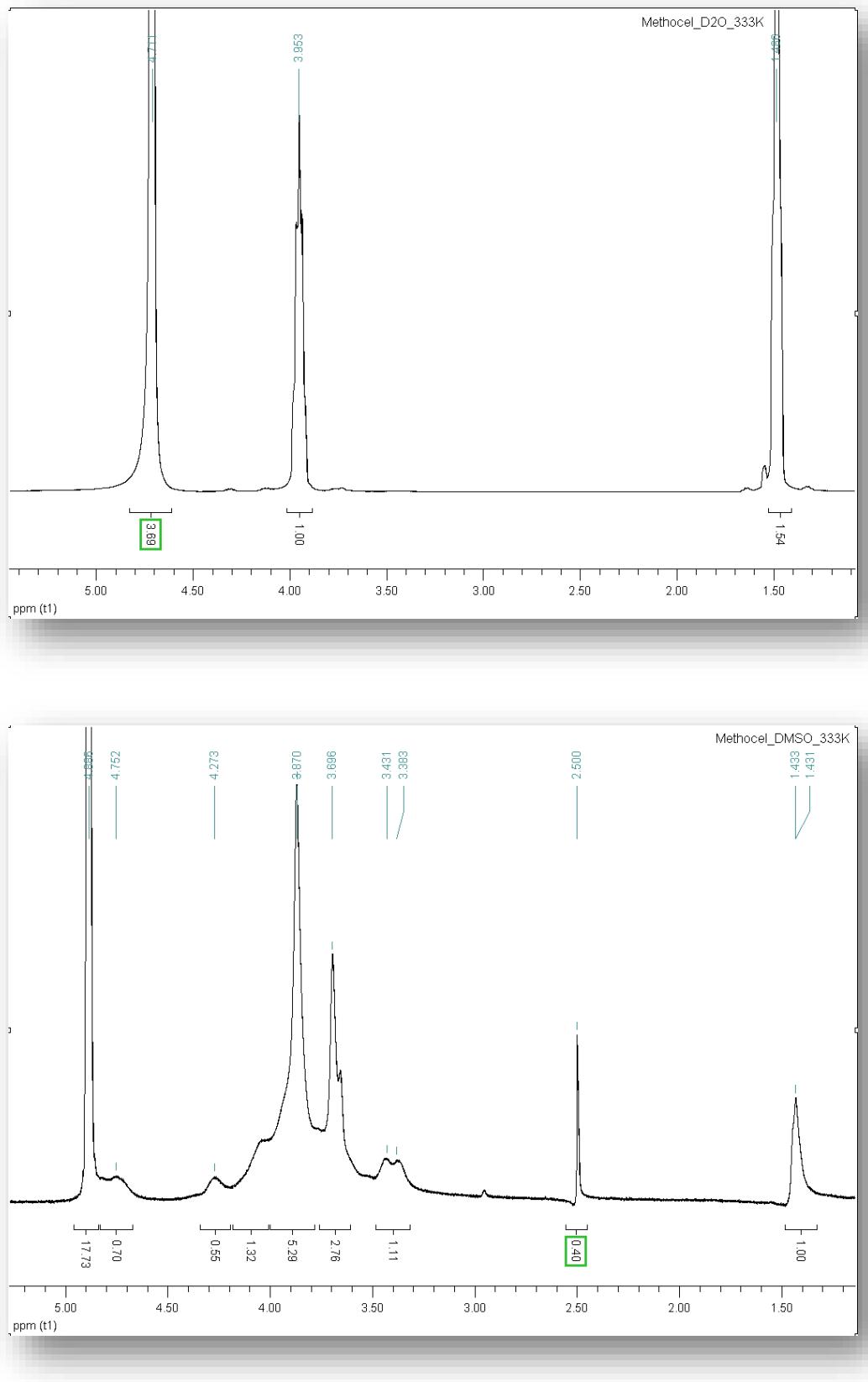
Preden smo injicirali vzorce v NMR tube smo jih prefiltrirali z 45- mikrometrskimi filtri, da smo se znebili nečistot in večjih delcev. Nato smo se odločili posneti vzorce različne viskoznosti brez uporabe filtrov, da vidimo, če pride do razlik v spektrih. Dobljeni spektri brez predpriprave s filtri se niso bistveno razlikovali od spektrov vzorcev, ki smo jih predhodno prefiltrirali. Odločili smo se še naprej filtrirati vzorce, ker je potem manjša možnost prisotnosti večjih spojin ali nečistot.



SLIKA 6: Primerjava spektrov najbolj viskoznega vzorca posnetih pri 20 °C v DMSO (spodaj) in D_2O (zgoraj).



SLIKA 7: Primerjava spektrov najbolj viskoznega vzorca posnetih pri 40 °C v DMSO (spodaj) in D_2O (zgoraj).



SLIKA 8: Primerjava spektrov najbolj viskoznega vzorca posnetih pri 60 °C v DMSO (spodaj) in D_2O (zgoraj).

4 POGlavje

REZULTATI IN REZPRAVA

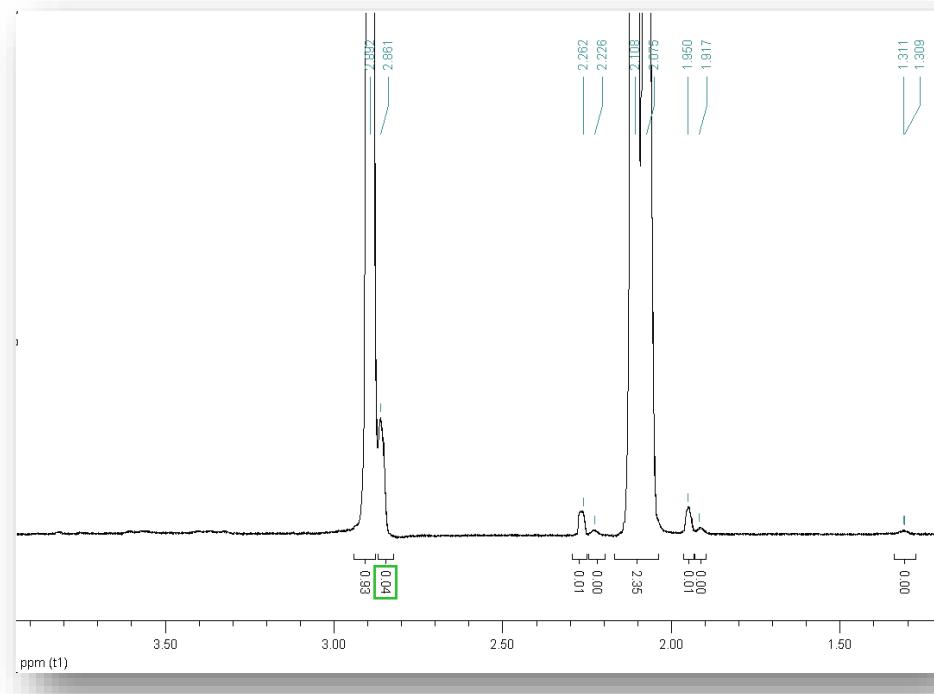
4.1 KVALITATIVNO VREDNOTENJE SPEKTROV

Pri hipromelozi so značilni vrhovi metilnih skupin, hidroksipropilnih skupin in glukoznih skupin. Glukozne skupine so ponavljajoče se enote in posledično dobimo v spektrih polimerov celuloze enake vrhove za glukozne enote, kot bi jih dobili v spektrih monomerov glukoze.

Kemijski premiki devteriranih topil so:

- DMSO: 2.50 ppm
- D₂O: 3.3 ppm
- Aceton – d6: 2.05 ppm
- MeOD: 4.78 ppm
- CDCl₃: 7.24 ppm

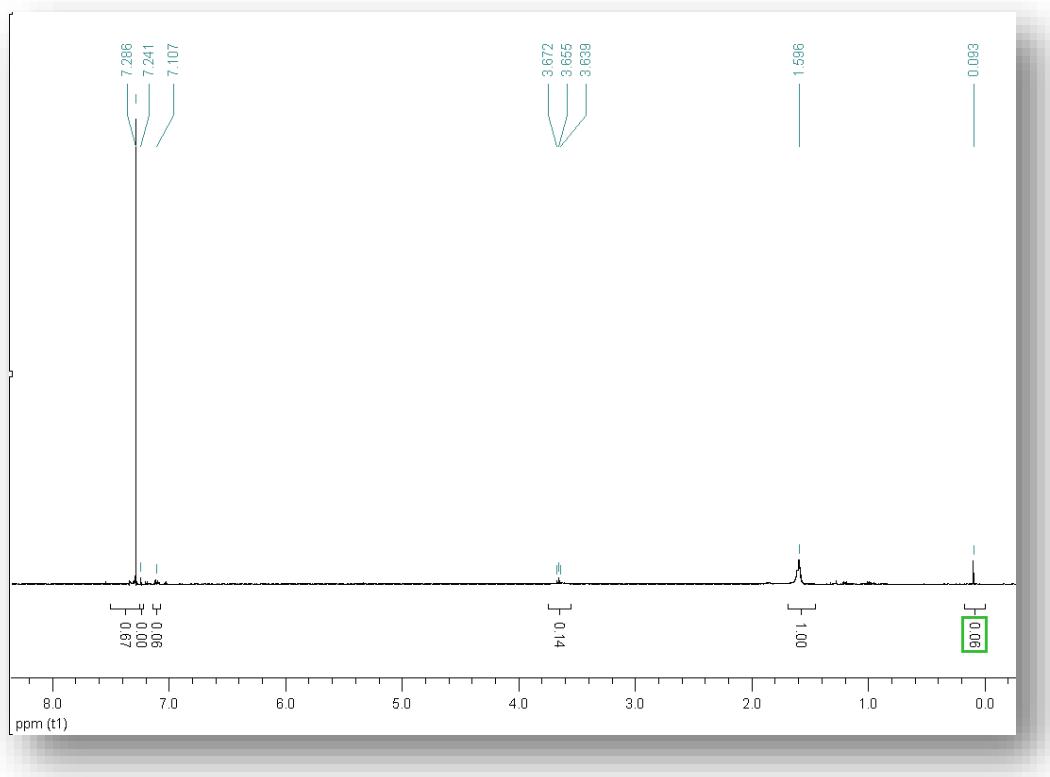
Signali metilnih enot se v spektrih pojavljajo v območju med 2.20 ppm in 1.60 ppm. Signali hidroksipropilnih skupin se pojavljajo v območju med 1.50 ppm in 0.70 ppm (17).



SLIKA 9: Spekter Methocela 2910.

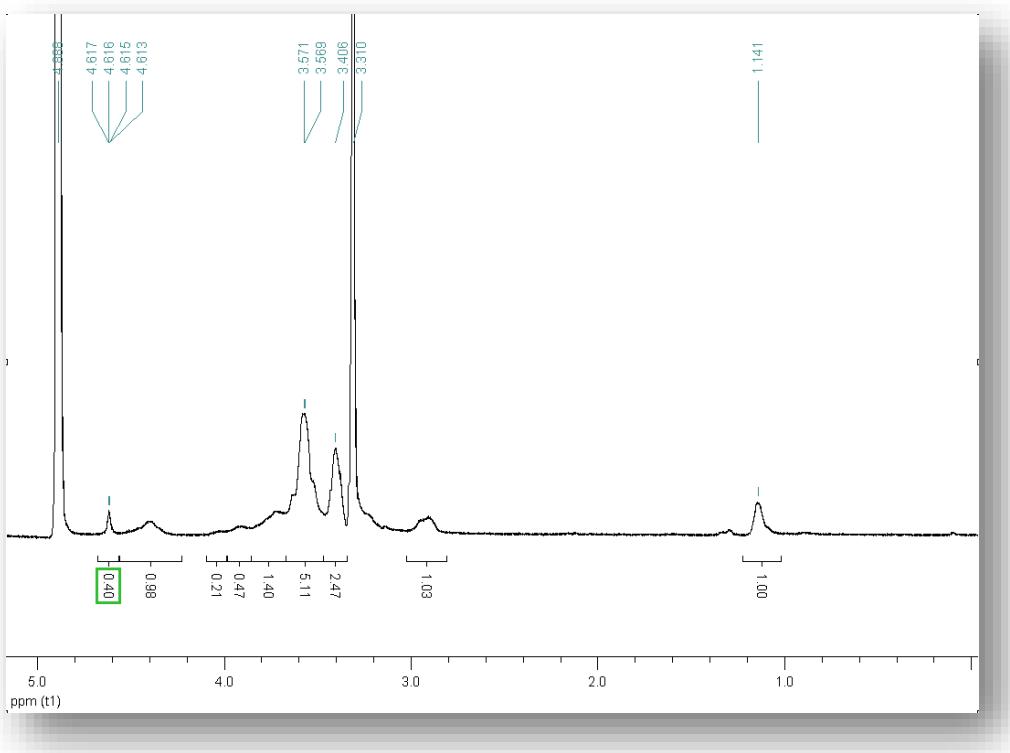
Rezultati in razprava

Methocel tipa 2910, raztopljen v acetonu - d6. Koncentracija vzorca posneta pri 20 °C je bila 40 mg/ml. Iz danega spektra vidimo da vrhovi niso jasno definirani in ostri. Viden je vrh topila okoli 2.1 ppm, ampak vrhov metoksi in hidroksipropoksi skupin ni, ker se vzorec ni popolnoma raztopil v topilu (Slika 9).



SLIKA 10: Spekter Methocela 2910.

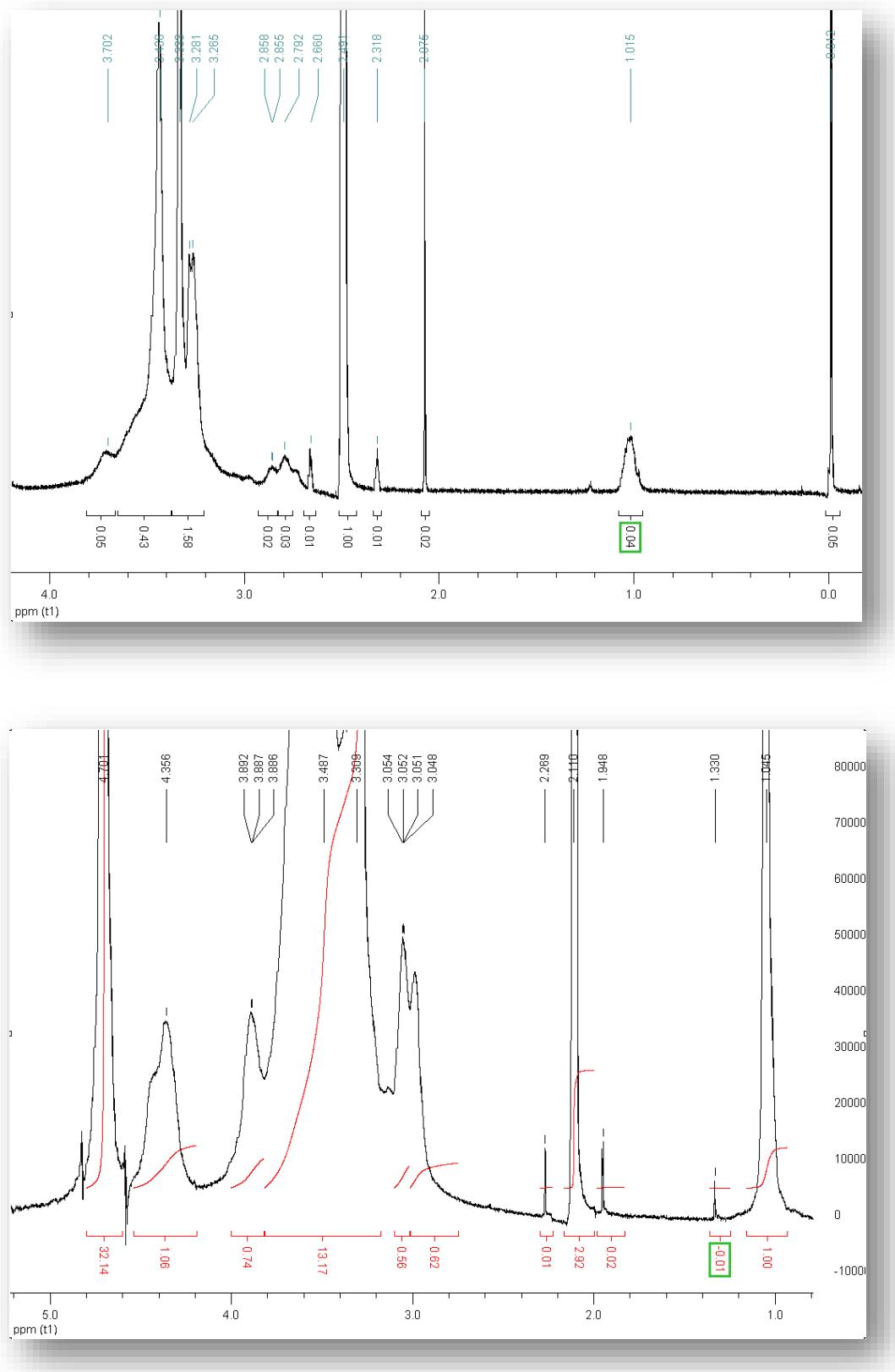
Methocel tipa 2910, raztopljen v CDCl_3 . Koncentracija vzorca je bila 40 mg/ml in spekter smo posneli pri temperaturi 20 °C. V spektru ni viden noben vrh, razen vrha topila, saj se vzorec ni raztopil v topilu. Neraztopljeni vzorec je bil viden na dnu bučke, v kateri smo ga pripravili (Slika 10).



SLIKA 11: Spekter Methocela 2910.

Methocel tipa 2910, raztopljen v MeOD. Koncentracija vzorca je bila 40 mg/ml in spekter smo posneli pri temperaturi 20 °C. Iz spektra je jasno razviden vrh topila, drugih iskanih funkcionalnih skupin ni (Slika 11).

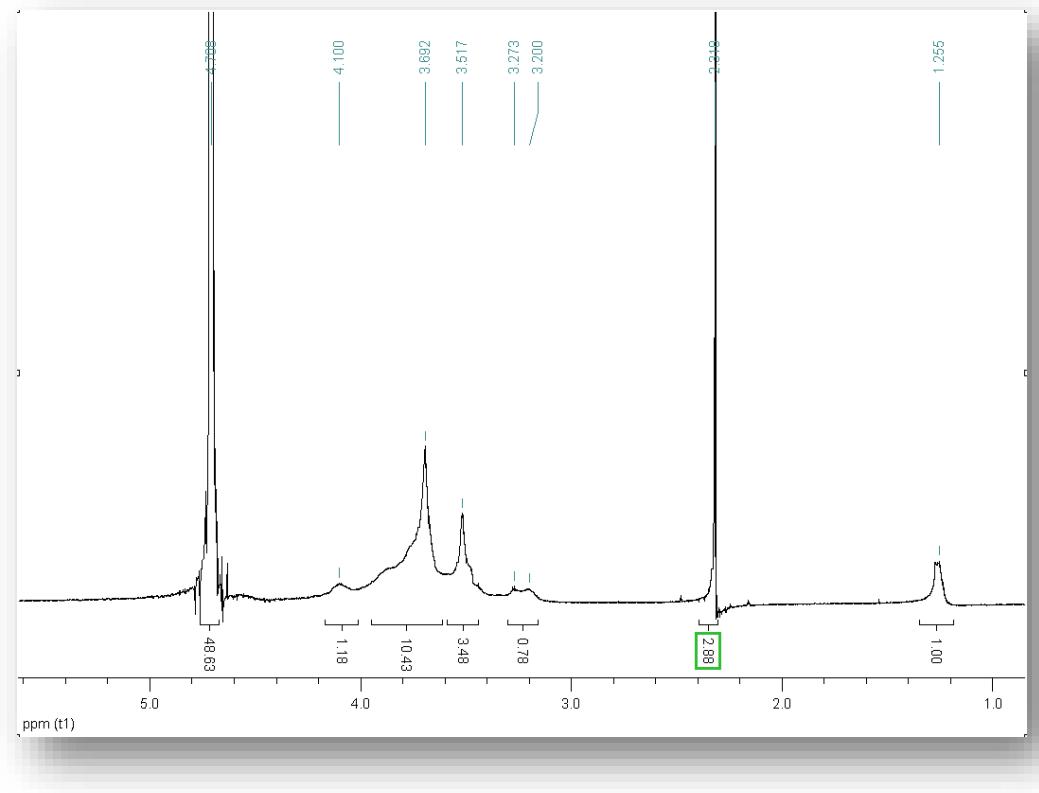
Rezultati in razprava



SLIKA 12: Spektra Methocela 2208.

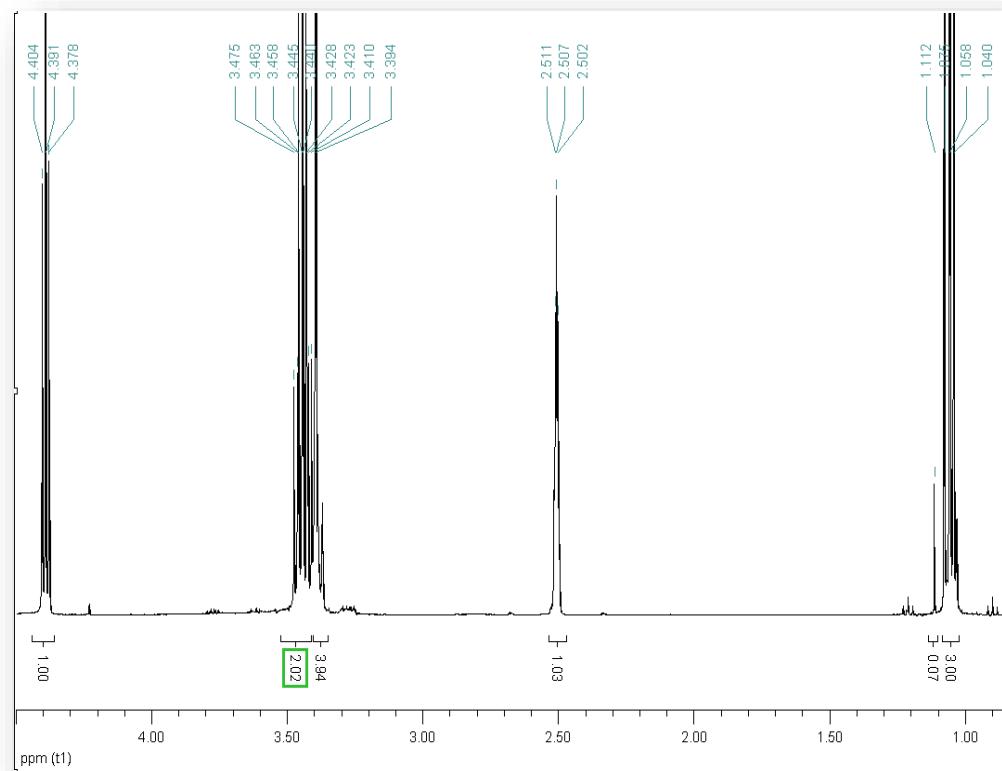
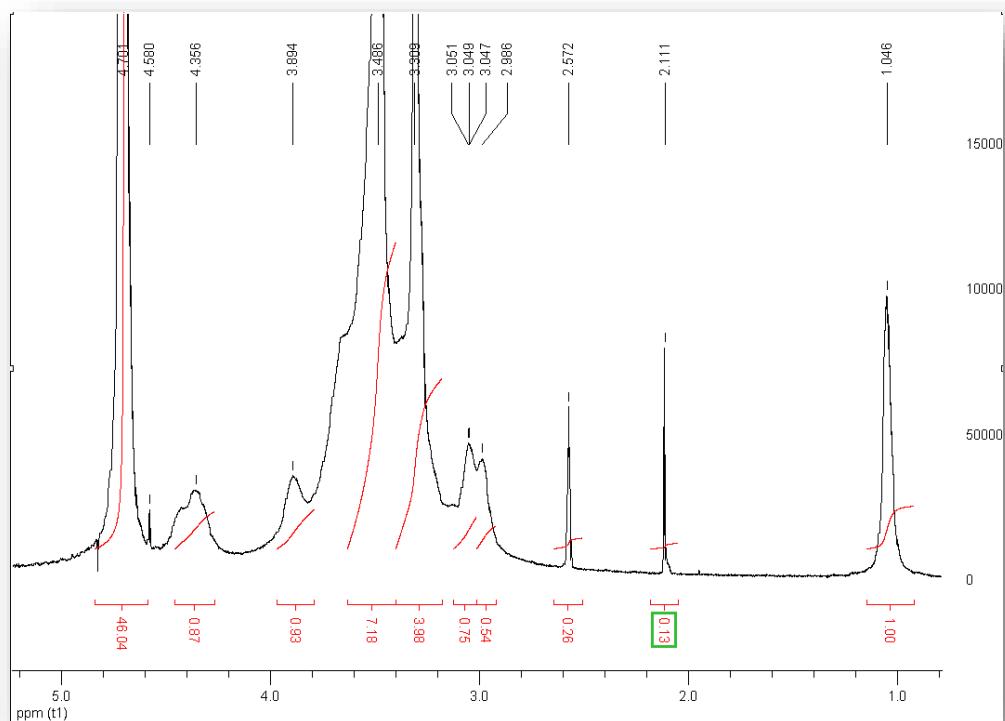
Rezultati in razprava

Methocel tipa 2208, raztopljen v DMSO-ju (zgoraj) in devterirani vodi (spodaj). Koncentracija vzorca je bila 20 mg/ml in vzorec smo posneli pri temperaturi 40 °C. V obeh spektrih so vidni vrhovi topil in iskanih funkcionalnih skupin. V spektru posnetem v devterirani vodi vidimo, da so vrhovi bolj razširjeni (Slika 12).



SLIKA 13: Spektra Methocela 2208.

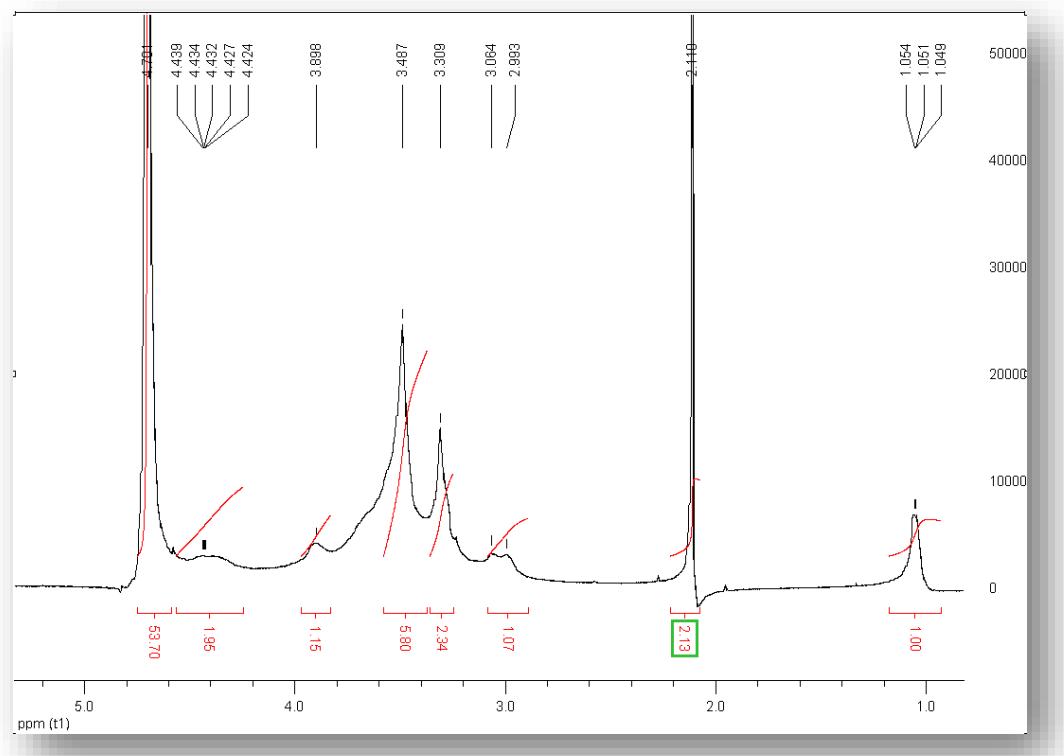
Methocel tipa 2208, raztopljen v devterirani vodi. Koncentracija vzorca je bila 20 mg/ml in vzorec smo posneli pri temperaturi 40 °C. Ta spekter smo posneli z rotacijo. Vrhovi so popačeni, kar nam ne ustreza za nadaljnjo obdelavo spektrov. Zato tudi nismo posneli nobenega spektra več s spinom (Slika 13).



SLIKA 14: Spektra Methocela 2910.

Rezultati in razprava

Methocel tipa 2910, raztopljen v devterirani vodi (zgoraj) in DMSO-ju (spodaj). Koncentracija vzorca je bila 20 mg/ml in vzorec smo posneli pri temperaturi 40 °C. Iz spektrov lahko vidimo, da spekter, posnet v DMSO-ju, ni optimalen. Vrhovi se prekrivajo in niso jasno ločeni med seboj (Slika 14).

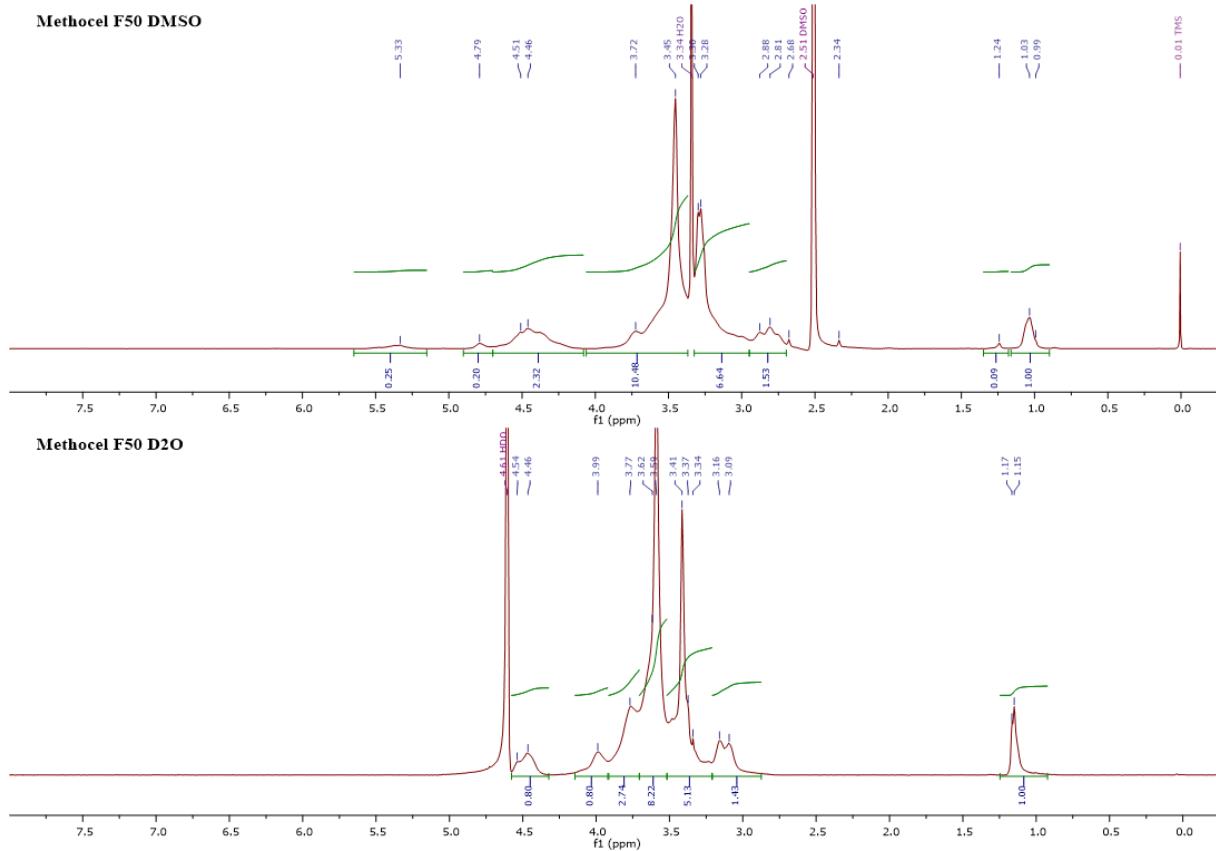


SLIKA 15: Spekter Methocela 2910.

Methocel tipa 2910, raztopljen v devterirani vodi. Koncentracija vzorca je bila 20 mg/ml in vzorec smo posneli pri temperaturi 60 °C. Iz spektra je vidno, da vrhovi niso jasno ločeni med seboj in so razvlečeni. Ko smo vzeli vzorec iz aparature, smo videli da je začel gelirati. To je tudi razlog, zakaj spekter ni bil primeren za našo nalogo (Slika 15).

4.2 IZBIRA USTREZNEGA TOPILA IN POGOJEV SNEMANJA

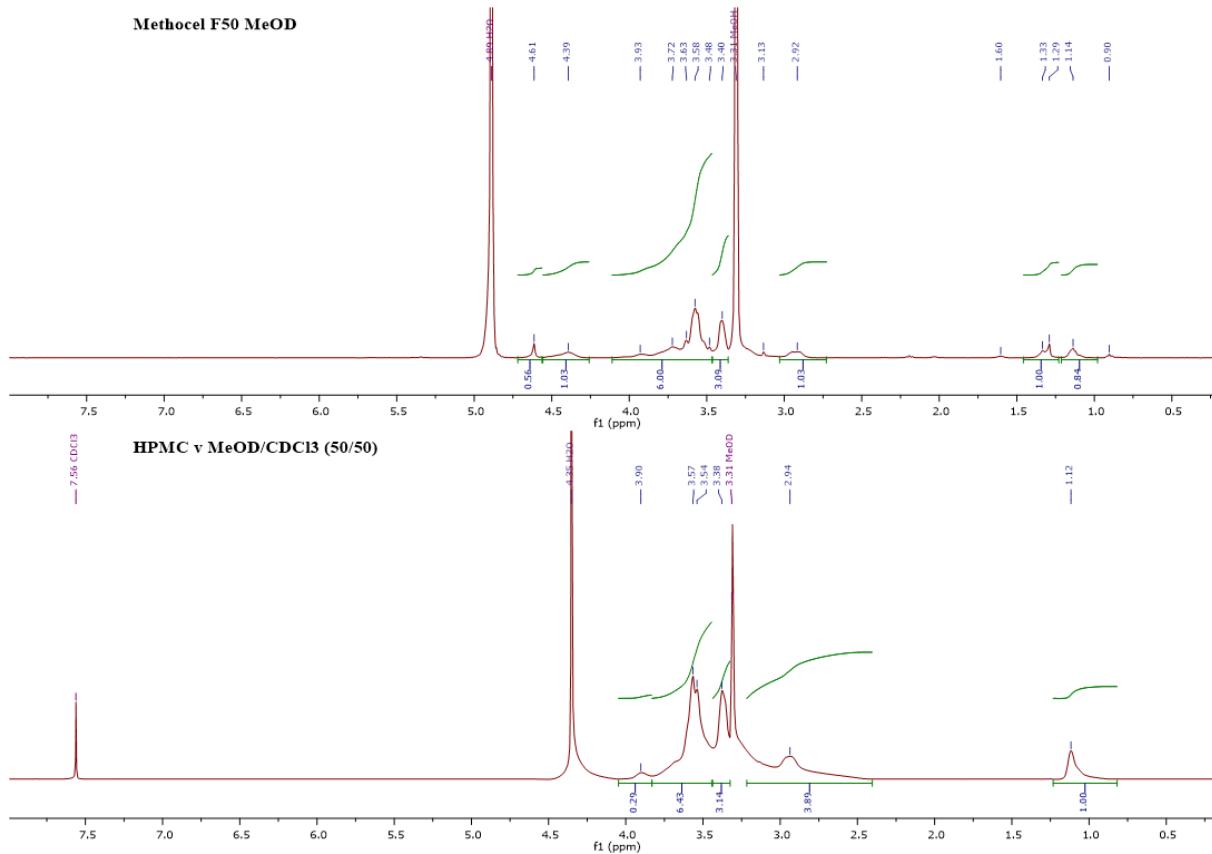
4.2.1 IZBIRA USTREZNEGA TOPILA



SLIKA 16: Primerjava spektrov Methocela F50 raztopljenega v DMSO (zgoraj) in D₂O (spodaj).

V DMSO-ju je vidnih več signalov, kar nam daje večje možnosti asignacije posameznih signalov ter možnost uporabe različnih skupin za kvantifikacijo. Vendar se vrhovi vzorca prekrivajo z vrhom vode. Voda, je prisotna že v samem topilu (kot nečistota), zaradi česar dobimo napačno določene površine vrhov vzorca. V devterirani vodi so vrhovi slabše ločeni med seboj, vendar se znebimo vrhov prostih OH skupin, saj se protoni izmenjajo s protoni topila, zato nam proste OH skupine ne motijo integracije ostalih signalov (Slika 16).

Rezultati in razprava

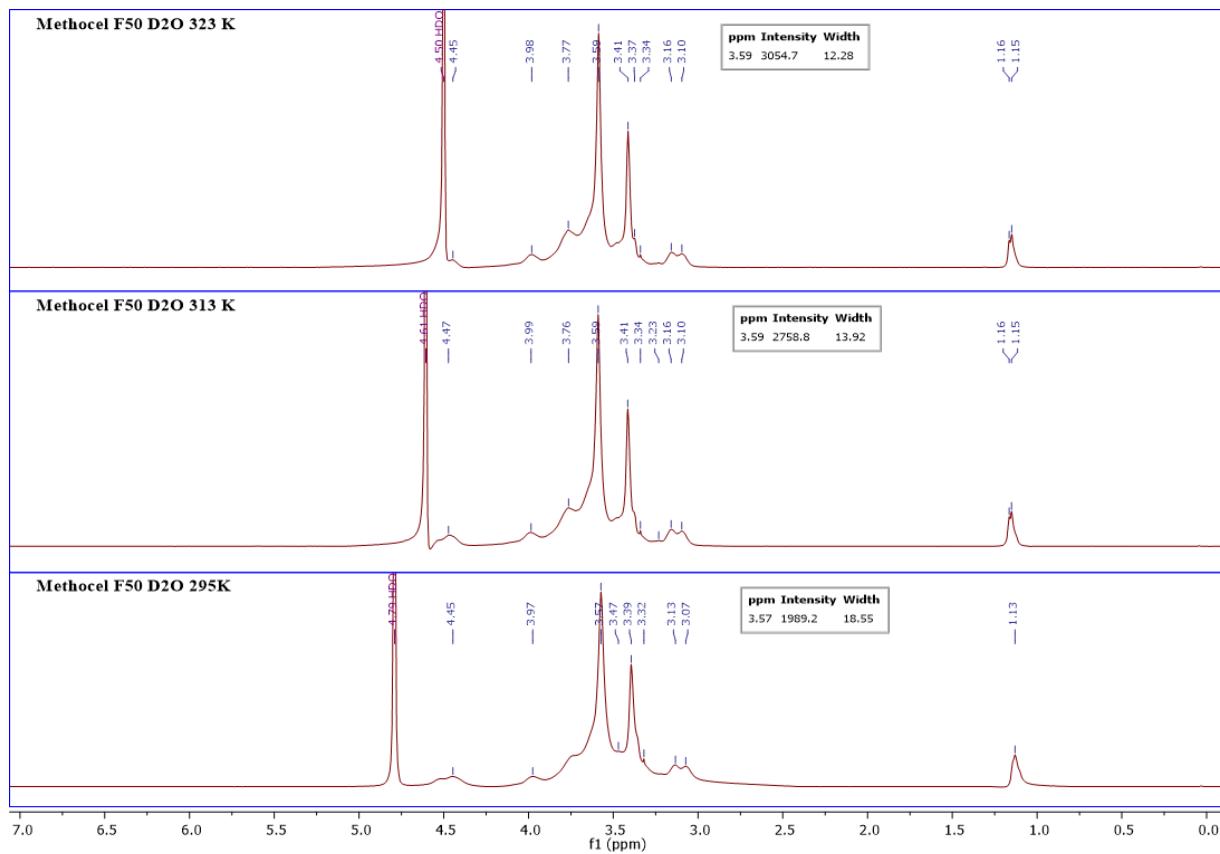


SLIKA 17: NMR spekter vzorca Methocela F50 v MeOD (zgoraj) in vzorca Methocela 50/50 v zmesi MeOD in CDCl₃ (spodaj).

Topnost hipromeloze v devteriranem metanolu je problematična, saj se večina vzorcev raztopi le deloma. Za snemanje spektra smo si pomagali s filtracijo vzorca skozi 0.45 - mikrometrski filter. Ker je po podatkih proizvajalca topnost hipromeloze boljša v zmesi devteriranega metanola in devteriranega diklorometana, smo vzorce raztopili še v zmesi devteriranega metanola in kloroformu. Ta se je izkazala za neustrezno, saj se vrhovi vzorca prekrivajo z vrhom rezidualnega metanola.

V acetonu in samem kloroformu vzorci niso bili topni (Slika 17).

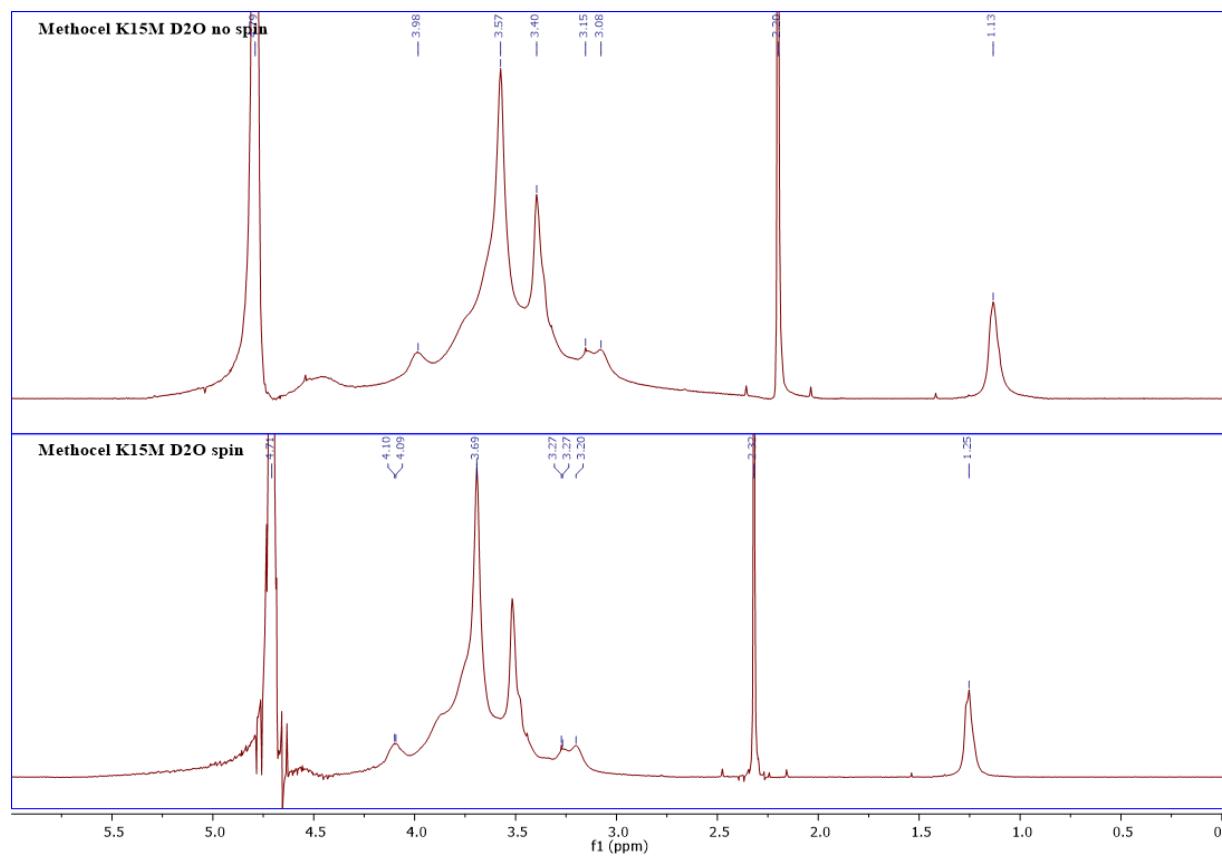
4.2.2 VPLIV TEMPERATURE VZORCA



SLIKA 18: NMR spektri Methocela F50 posnetih pri različnih temperaturah.

NMR spektri istega vzorca, posneti po različnih temperaturah: z višanjem temperature, se zmanjšuje viskoznost vzorca, zato so signali ožji ter bolj razčlenjeni. Spreminja pa se tudi kemijski premik vrha topila, ki se pri temperaturah nad 40 °C prekriva z vrhom vzorca, zato so v našem primeru temperature nad 40 °C neprimerne. Poleg tega nam lahko HPMC nad 60 °C tvori gel, ki onemogoči snemanje spektra (Slika 18).

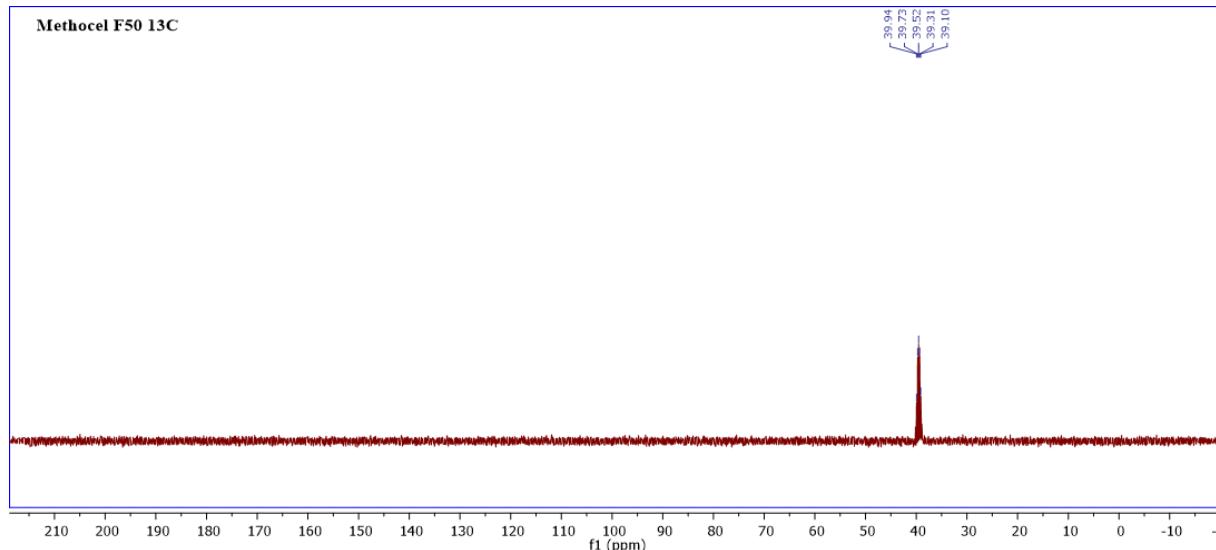
4.2.3. VPLIV ROTACIJE



SLIKA 19: NMR spektra vzorca Methocel K15M posneta s spinom (spodaj) in brez spina (zgoraj).

Isti vzorec smo posneli brez rotacije spina pri 20 °C (zgoraj) in z rotacijo spina (spodaj) pri 40 °C. Vrtenje povzroči popačenje signalov, zato v našem primeru ni primerno. Pri snemanju spektrov z rotacijo spina pride do preusmeritve spinske magnetizacije zaradi vpliva pulza resonančnega elektromagnetnega sevanja (Slika 19).

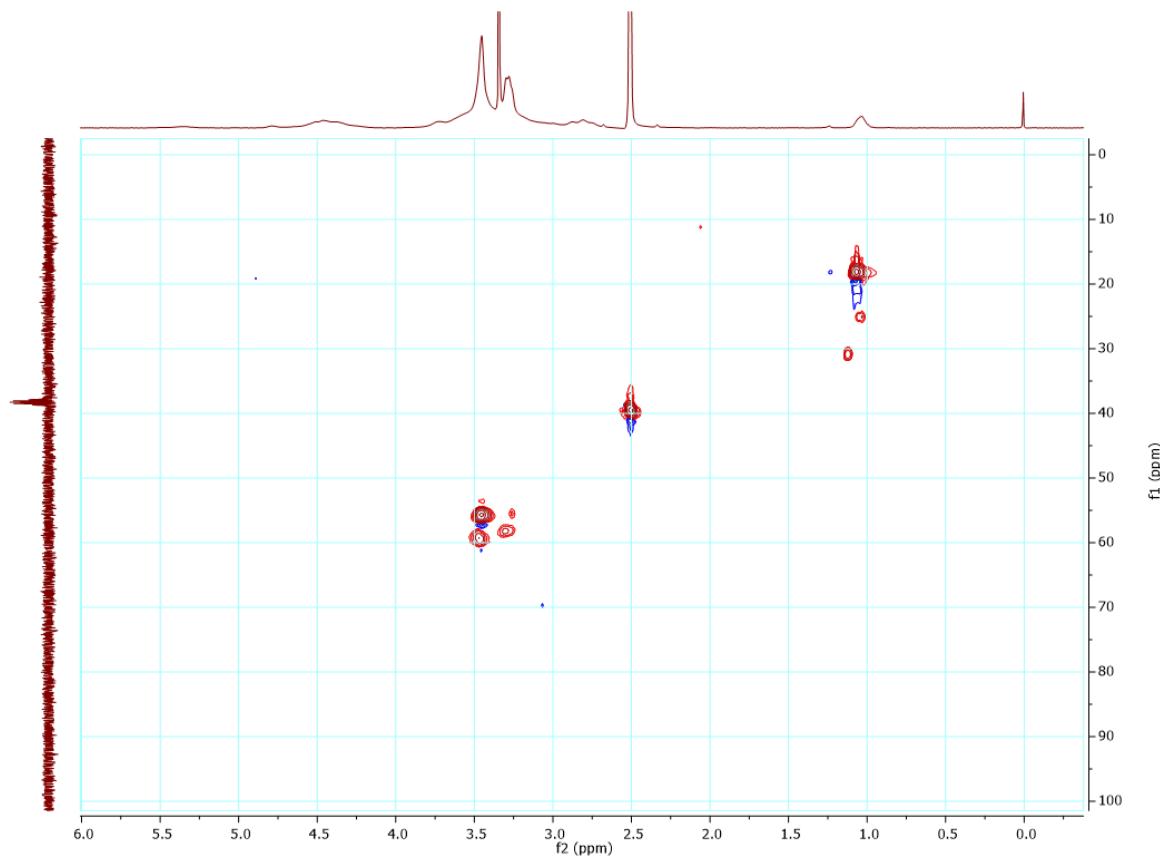
4.2.4. ASIGNACIJA POSAMEZNIH SIGNALOV



SLIKA 20: ^{13}C spekter vzorca HPMC F50 v DMSO.

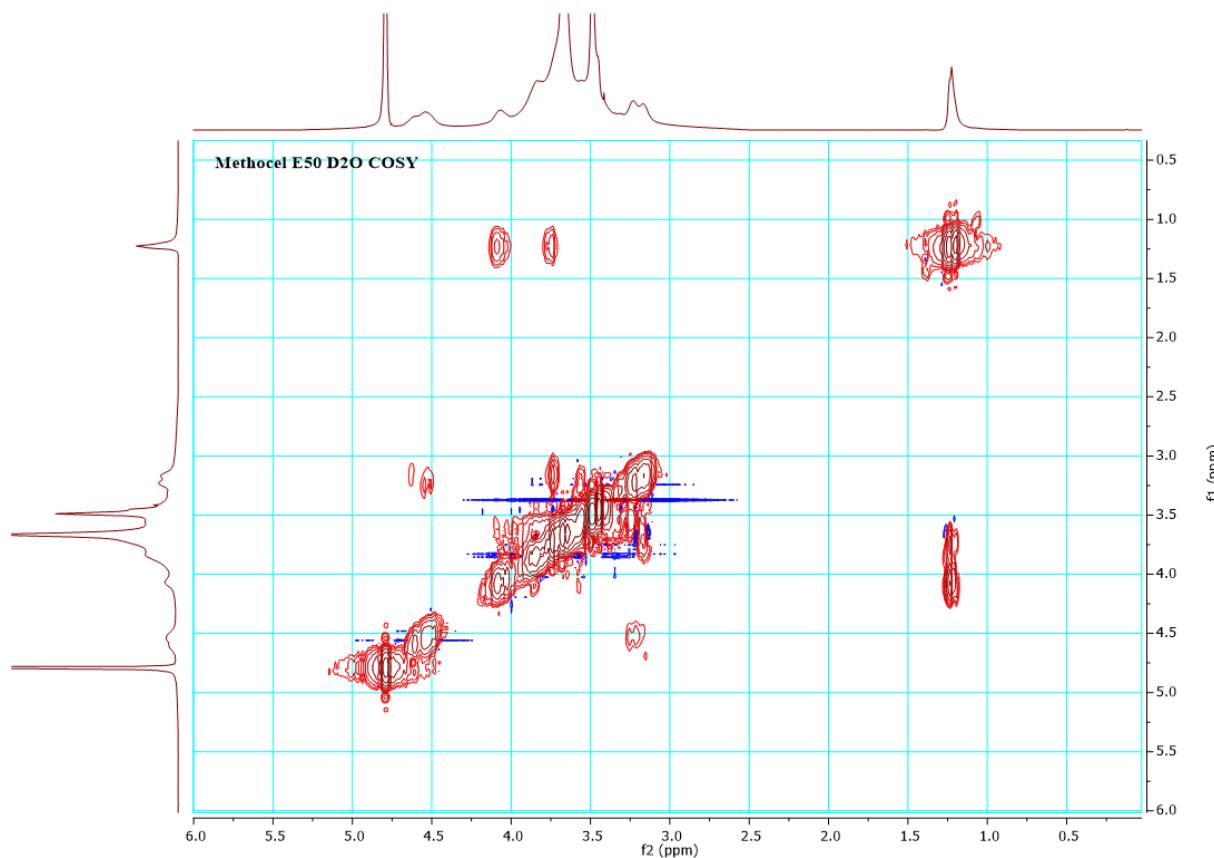
Vidni so samo signali topila okrog 3.9 ppm, medtem ko za C atome hipromeloze kljub številnim poizkusom snemanja spektrov pod različnimi pogoji nismo dobili zadovoljivih signalov. Za snemanje ^{13}C smo izvedli številne poizkuse in poskušali s spremenjanjem temperature, koncentracije, topila in števila scanov. Poskušali smo posneti spektre pod enakimi pogoji, kot so jih uporabili v drugih raziskavah pri snemanju spektra ^{13}C NMR. Tu je bil problem, da jih je večina vzorec predhodno acetilirala in tako preprečila izmenjavo med H atomi našega polimera in devteriranim topilom. Večinoma so bili spektri neuspešno posneti, saj so se izkazali vzorci za preveč viskozne, signali so bili preširoki, med seboj so se prekrivali ali pa pri nekaterih spektrih sploh ni bilo vidnih signalov, z izjemo signala topila (Slika 20).

Rezultati in razprava



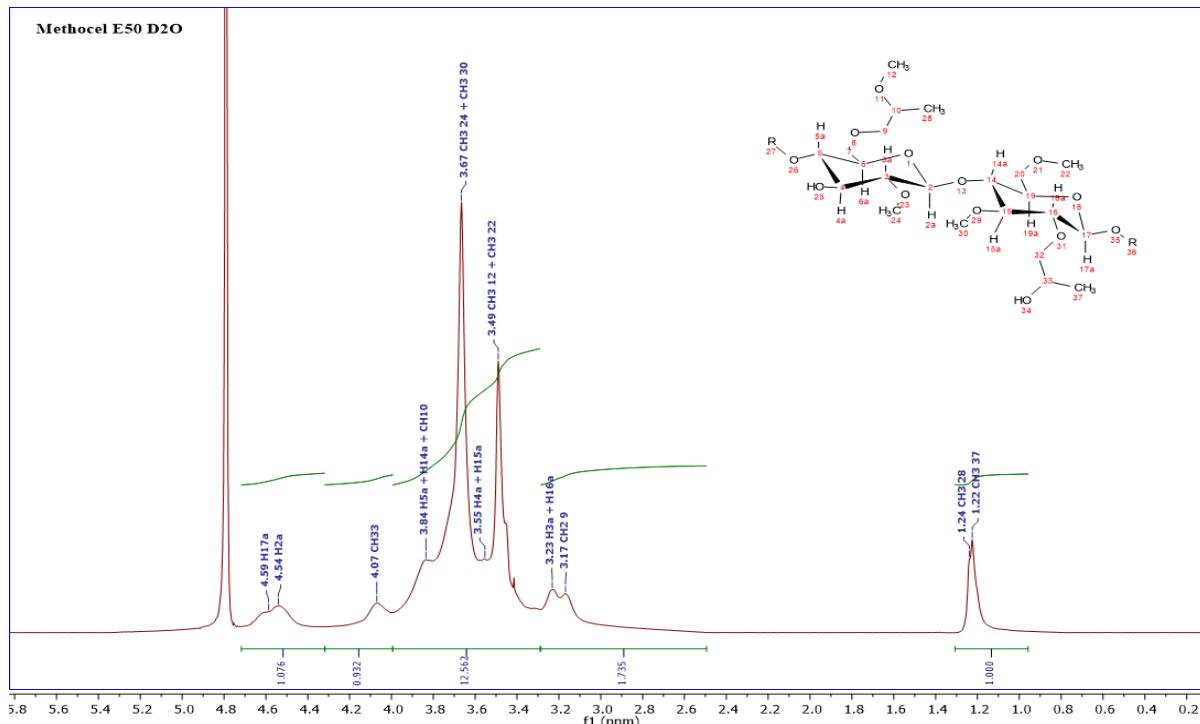
SLIKA 21: HSQC spekter vzorca Methocel F50 v DMSO.

Pri HSQC smo podatke o ¹³C skušali dobiti posredno. Pri $1 \text{ ppm} \times 1.9 \text{ ppm}$ so vidni signali metilnih skupin, ki so pripete na hidroksipropoksi skupine (Slika 21).



SLIKA 22: COSY spekter Methocela E50.

COSY spekter vzorca Methocela E50 v D₂O, iz katerega so vidne medsebojne sklopite protonov, ki so vezani na sosednje C atome. Zaradi različnih substitucij osnovne glukozne enote imajo protoni posameznih skupin več signalov. Pri 1.3 ppm×1.3 ppm so vidne sklopite metilnih skupin, ki so pripete na hidroksipropoksi skupine. Pri 4.7 ppm×4.7 ppm so vidne sklopite H atomov, ki so pripete na C1 atom v glukozi (Slika 22).



SLIKA 23: Asignacija signalov vzorca Methocela E50, na podlagi COSY spektra in literature.

Na sliki 23 sta prikazani 2 izmed številih možnih (različno substituiranih) glukoznih enot. Signalni protonov, ki niso eksplisitno navedeni, se nahajajo pod ostalimi signali v območju med 4.3 in 2.8 ppm. Vrhova pri 1.2 ppm pripadata metilnima skupinama v hidroksipropoksi skupinah. Vrhova, ki sta pri 4.6 ppm, predstavljata anomerna H atoma na C1 atomu glukoze. Slednja dva sta ključna za kvantitativno določanje deleža metoksi in hidroksipropoksi skupin v hipromelozi (19).

4.2.5 STANDARDIRIZIRANI POGOJI IN OBDELAVA SPEKTROV

Za kvantitativno delo morajo biti pogoji obdelave spektrov nepristranski in za vse vzorce enaki.

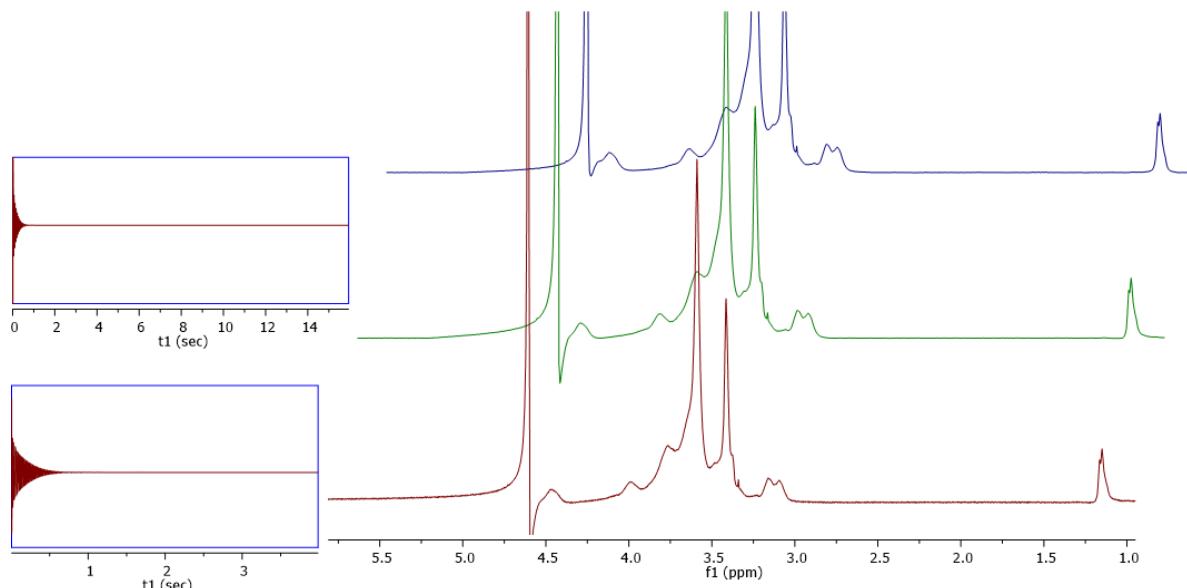
Standardizirani pogoji za snemanje spektrov ^1H NMR so prikazani v preglednici 5.

Rezultati in razprava

PREGLEDNICA 5: Standardizirani pogoji za snemanje ^1H NMR spektrov (20).

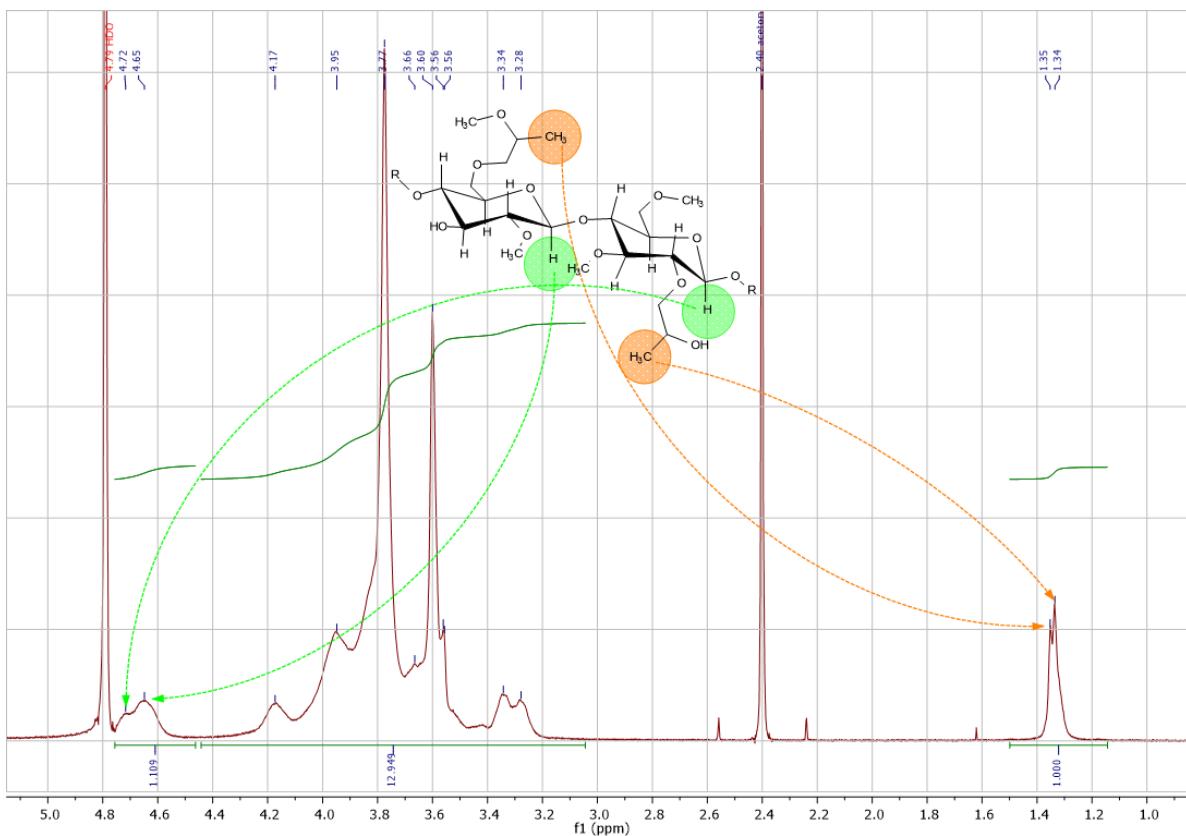
Temperatura	40 °C
Topilo	D ₂ O
Pulzna sekvenca	Zg30
Kot magnetizacije	30 °
Čas zajema signala	3.98 s
Spektralna širina	8223.7 Hz
Število ponovitev	16
Vmesni čas	1 s
Obdelava signala	Eksponentno 0.3 Hz
Korekcija faze	Ročna
Korekcija bazne linije	Samodejna

4.2.6 PROCESIRANJE SPEKTROV



SLIKA 24: Primerjava spektrov istega vzorca obdelave.

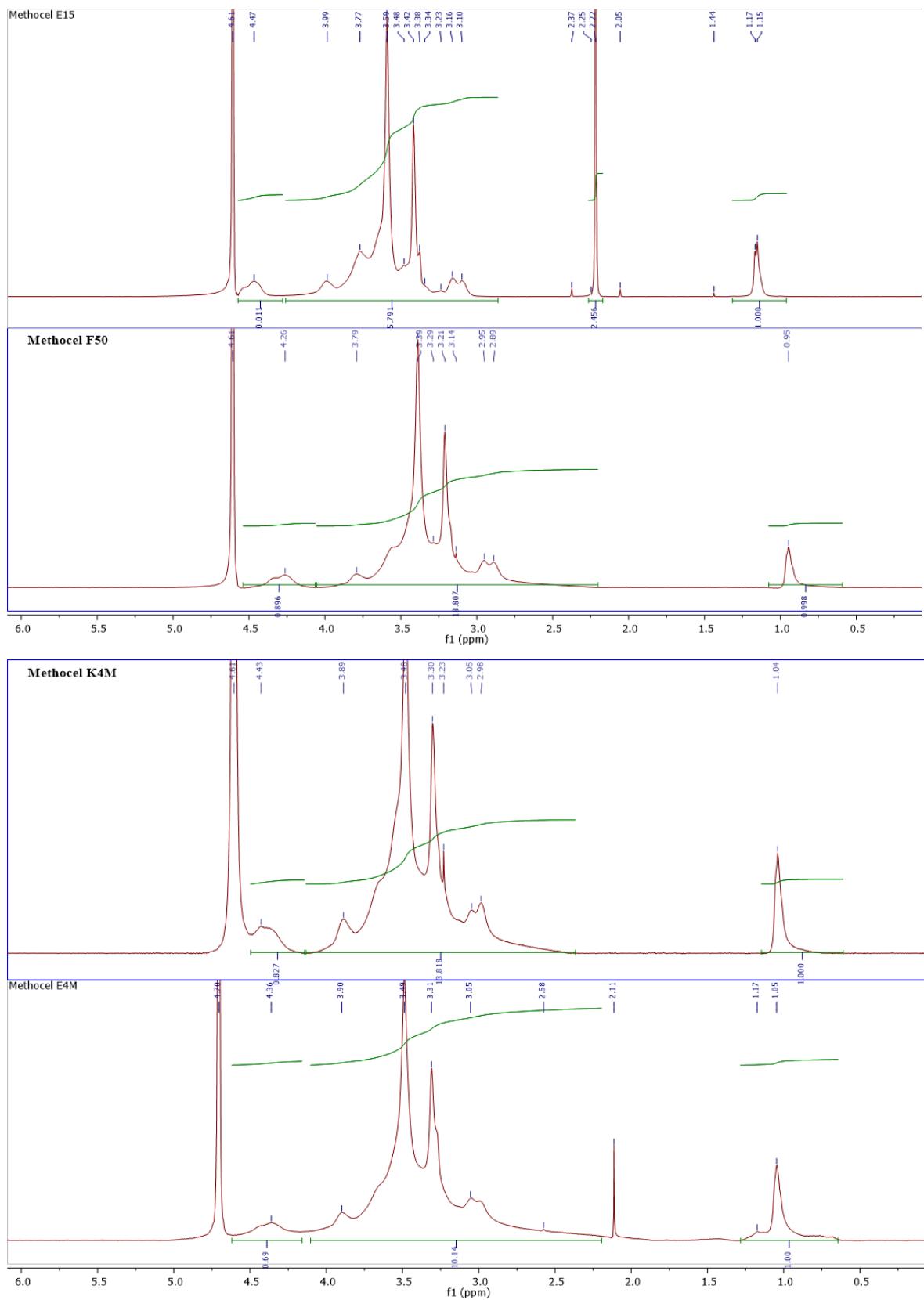
Primerjava istega spektra obdelave FID-a (spodaj) z uporabo apodizacijske in zero filling funkcije (na sredini) ter z obdelavo FID-a in ročno uravnano faze (zgoraj) (Slika 24).



SLIKA 25: Spekter Methocela F50.

Ključni signali, na podlagi katerih skušamo kvantitativno oceniti vsebnost hidroksipropoksi in metoksi skupin v HPMC. Pri izračunu upoštevamo površino vrhov hidroksipropoksi CH_3 skupine, to je vrh pri 1.3 ppm. Upoštevati moramo tudi površino vrhov glikozidnih protonov na mestu 4 ter skupno površino vseh ostalih protonov (3 – 4.4 ppm). Signal pri 4.7 ppm, pripada anomernima H atomoma na C1 atomoma glikozidne enote (Slika 25).

Rezultat in razprava



SLIKA 26: Primerjava spektrov z različno stopnjo viskoznosti.

Primerjava spektrov, vzorcev raztopljenih v DMSO-ju z različno stopnjo viskoznosti. Pri 1 ppm vidimo vrh za metoksi skupino. Imamo jasno izražen vrh topila DMSO-ja. Ta se za razliko od vrha devterirane vode ne prekriva z drugimi vrhovi. Pri vodi pride do izmenjave protonov in zato so vrhovi med sabo slabše ločeni (Slika 26).

4.3 DELEŽ METOKSI IN HIDROKSIPROPOKSI SKUPIN

Problem pri izračunu deleža metoksi in hidroksipropoksi skupin je bil v večini primerov v topilu. V spektrih posnetih v DMSO-ju smo videli vrhove nečistot oziroma topila. Med vzorci sta bila problematična samo vzorca HPMC tipa K in F v vodi. Nismo ju uspeli spraviti v ustrezeno fazo. Signal, ki pripada anomernem H atomu na C1, je ključen za integracijo, ampak se prekriva s signalom za vodo (4.7 ppm). Ostale H atome glukoze dobimo tako, da tega pomnožimo s 6 (iz spektra vidimo samo H-je, ki so na C atomih, ker je topilo devterirana voda in morebitne OH skupine niso vidne zaradi izmenjave protonov).

Če od skupne površine odštejemo površino 1. vrha ($i\text{Pr} - \text{CH}_3$) ter 6-kratno površino anomernega H, nam ostanejo površine metoksi skupin. Problem je pri spektrih, v katerih se skupna površina prekriva z nečistotami (npr. vrhom acetona, metanola ali etanola). Druga težava pri določanju deleža je, da ne poznamo stopnje substitucije. Kvantitativno torej lahko izračunamo približno – npr. predpostavimo, da je povprečna stopnja substitucije 2,2. Ta podatek upoštevamo pri molski masi glukoznega fragmenta, ki je torej $\text{C}_6\text{H}_7\text{O}_2 + 0,8 \text{ OH}$ oziroma $111,2 + 13,61 = 124,73$.

Formula za izračun deleža metoksi skupin (Enačba 2): (22, 23)

Da bi dobili mase fragmentov (M) upoštevamo njihovo molekulsko maso in število H atomov v vsaki skupini.

$$MS = \frac{M(\text{CH}_3)}{M(\text{CH}_3) + M(\text{anomerni H atom}) + M(\text{glukoza})}$$

Formula za izračun deleža hidroksipropoksi skupin (Enačba 3): (22, 23)

$$HP = \frac{M(\text{anomerni H atom})}{M(\text{CH}_3) + M(\text{anomerni H atom}) + M(\text{glukoza})}$$

Rezultati in razprava

M(CH3)...površina signalov metilnih protonov s hidroksipropoksi skupin

M(anomerni H atom)...površina signalov protonov anomernih H atomov, ki so pripeti na 1C atome glukoze

M(glukoza)...površina signalov protonov glukoze

Delež metoksi in hidroksipropoksi skupin, v preiskovanih vzorcih

Methocel F50:

%MS = 167

%HP = 0.067

Methocel K4M

%MS = 0.186

%HP = 0.077

Methocel E4M

%MS = 0.232

%HP = 0.086

Za ostale vzorce nismo uspeli dobiti zanesljivih podatkov, iz katerih bi lahko preračunali deleža iskanih funkcionalnih skupin. Da bi dobili spektre s primerljivimi rezultati bi morali optimizirati pogoje snemanja. Pri optimizaciji se moramo predvsem posvetiti pripravi vzorca za snemanje. Če ne bi bili časovno omejeni, bi lahko poskusili izboljšati rezultate spektrov tako, da bi proste OH skupine acetilirali in s tem preprečili izmenjavo prostih H atomov z devteriranim H atomom topila. S tem bi se izognili prekrivanju. Nismo pričakovali, da se nekateri od vzorcev niso popolnoma raztopili v topilu. Kljub temu da smo jih pustili čez noč na stresalniku. Raztabljanje smo dosegli šele, ko smo jih dali v zvočno kadičko. Vzorci so se bolje raztabljalni, če smo namesto stresanja čez noč večkrat injicirali vzorec iz brizge v merilno bučko in obratno. Lahko bi poskusili še dodatno optimizirati pogoje snemanja in tako izboljšati kakovost spektrov.

5 POGlavje

SKLEP

HPMC je danes eden izmed najpogosteje uporabljenih polimerov v industriji zaradi svojih lastnosti, ki mu omogočajo širok spekter uporabe na več različnih področjih. Pri kvantitativnem določanju deleža metoksi in hidroksipropksi skupin je trenutno v monografiji evropske farmakopeje uporabljena le plinska kromatografija. Kljub temu število raziskav na področju analize HPMC-ja z NMR narašča in te predstavljajo prednosti NMR metode pred zamudno plinsko kromatografijo.

Metodo kvantitativnega določanja preiskovanih skupin smo optimizirali do te mere, da smo izrazito zmanjšali njen časovni potek, količino porabljenih reagentov in posledično znižali stroške izvedbe eksperimentov. Pri naši metodi vzorcev nismo predhodno acetilirali. S tem smo čas priprave vzorcev zmanjšali za vsaj nekaj ur. Čeprav smo zmanjšali čas priprave vzorcev, pa so se pri večini spektrov pojavile težave zaradi prostih OH skupin, ki jih nismo derivatizirali.

Iz naših rezultatov je razvidno, da je pri kvantitativnem določanju problem predvsem v tem, da se je ključni anomerni H atom na C1 enoti prekrival s signalom vode in ju nismo mogli ločiti. Brez jasnega vrha anomernega H atoma pa nismo mogli preračunati deleža iskanih skupin. Dobljeni spektri niso bili vsi dovolj ustreznih za nadaljnjo raziskavo. Tako da bi morali izboljšati pogoje snemanja. Lahko bi poskusili uporabiti tehnike, ki so jih uporabili v drugih raziskavah za snemanje spektrov HPMC. Število preučevanj na to temo sicer narašča, a trenutne raziskave uporabljajo raznolike tehnike. Za snemanje spektrov bi uporabili DMSO in ne devterirane vode, ker pri slednji pride do izmenjave protonov. Možnost bi bila tudi uporaba mešanice različnih topil. S tem bi dosegli boljšo pripravo vzorcev in izboljšali bi lahko tudi snemanje spektrov.

Rezultat in razprava

Podaljšali bi čas snemanja spektrov, povečali bi število scanov. Če bi uspeli optimizirati pogoje za snemanje spektrov ^{13}C , bi lahko potem dobili spektre HSQC ($^{1}\text{C} - ^{1}\text{H}$ spekter) in iz teh bi lahko videli, kateri C atomi se med seboj sklapljajo. Na podlagi tega bi lahko natančno določili, kateri vrhovi predstavljajo določeno funkcionalno skupino. Posledično bi lahko zanesljivo določili površine vrhov funkcionalnih skupin, potrebnih za izračun deleža metoksi in izopopoksi skupin v polimeru.

6 POGLAVJE

LITERATURA

- [1]: European Pharmacopoeia 7.0, 2010, 2219.
- [2]: Aleš Obreza, Bernarda Bevc, Saša Baumgartner, Marija Sollner Dolenc, Marjeta Humar: Pomožne snovi v farmaciji od njihovega poimenovanja do delovanja v zdravilu, Univerza v Ljubljani, fakulteta za farmacijo, Ljubljana, 2015, 102.
- [3]: Dipti Phadtare, Ganesh Phadtare, Nilesh B, Mahendra Asawat: Hypromellose – A choice of polymer in extended release tablet formulation. World journal of pharmacy and pharmaceutical sciences 3, 2014, 551 – 566.
- [4]: Sara Richardson, Lo Gorton: Characterisation of the substituent distribution in starch and cellulose derivates, Analytica Chimica Acta, 497, 2003, 29 – 30.
- [5]: Journal of Pharmaceutical Science, 3. 1664 - 1672, 2014.
- [6]: Robert L. Grob, Eugene F. Barry: Modern Practice of gas cromatography, John Wiley & Sons, Hoboken, 2004.
- [7]: Vesna Kuhelj: Preučevanje vpliva vrste hipromeloza na reološke lastnosti izdelanih vodnih raztopin, Univerza v Ljubljani, fakulteta za farmacijo, Ljubljana, 2011.
- [8]: C. Alvarez-Lorenzo, R.A. Lorenzo-Ferreira, J.L. Gomez-Amoza, R. Martinez-Pacheco, C. Souto, A. Concheiro: A comparison of gas-liquid cromatography, NMR spectroscopy and Raman spectroscopy for determination of the substituent content of general non-ionic cellulose ethers, Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 20, 1999, 373 – 383.
- [9]: James Keeler: Understanding NMR spectroscopy, John Wiley & Sons Ltd, West Sussex, 2010.
- [10]: <https://de.wikipedia.org/wiki/Kernspinresonanz> (12.8.2015).
- [11]: F. Malz, H. Jancke: Validation of quantitative NMR, Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 38, 2005, 813 – 823.
- [12]: Guido F. Paui, Shao – Nong Chen, Charlotte Simmler, David C. Lankin, Tanja Goedecke, Birgit U. Jaki, Brent Friesen, James B. McAlpine, Jose G. Napolitano: The importance of purity evaluation and the potential of quantitative ^1H NMR as a purity assay, Journal of Medical Chemistry 57, 2014, 9220 – 9231.

- [13]: Ulrike Holzgrabe: Quantitative NMR spectroscopy in pharmaceutical applications, Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy 57, 2010, 229 – 240.
- [14]: David A. Keire, Lucinda F. Buhse, Ali al-Hakim: Characterisation of currently marketed heparin products: composition analysis by 2D NMR, Analytical Methods, 5, 2013, 2984-2994.
- [15]: European Pharmacopoeia 8.0, 07/2013:1804, 2456 – 2458.
- [16]: <http://wwwffa.uni-lj.si/o-fakulteti/katedre/katedra-za-farmacevtsko-kemijo/oprema-in-storitve/> (5.9.2015).
- [17]: T. Andersson, S. Richardson, M. Erickson: Determination of the hydroxypropoxy content in hydroxypropyl cellulose by ^1H NMR, Pharmeuropa, 15, 2003, 271 – 273.
- [18]: Sara Richardson, Thomas Andersson, Gunnar Brinkmalm, Bengt Wittgren: Analytical approaches to improved characterisation of substitution in hydroxypropyl cellulose, Analytical Chemistry, 75, 2013, 6077 – 6083.
- [19]: Journal of Polymer Science:Part A: Polymer Chemistry, 37, 1999, 4019 – 4032.
- [20]: J. W. Emsley, j. Feeney, L. H. Sutcliffe: Progress in nuclear magnetic resonance spectroscopy, Pergamon Press, 57, 2010, 229 – 240.
- [21]: Adam Rachocki, Jadwiga Tritt-Goc: The molecular origin of nuclear magnetic relaxation in methyl cellulose and hydroxypropylmethyl cellulose, Journal of Polymer Research, 12, 2006, 201 – 206.
- [22]: Sara Richardson, Gunilla S. Nillson, Karl-Erik Bergquist, Ilo Gorton, Petra Mischnick: Characterisation of the substituent distribution in hydroxypropylated potato amylopectin starch, Carbohydrate Research, 328, 2000, 365 – 373.