

Istraživanje mehanokemijskih polimorfnih transformacija Ramanovom spektroskopijom in situ

Vugrin, Leonarda

Master's thesis / Diplomski rad

2021

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Chemical Engineering and Technology / Sveučilište u Zagrebu, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:149:376474>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-10-20**



Repository / Repozitorij:

[Repository of Faculty of Chemical Engineering and Technology University of Zagreb](#)



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE
SVEUČILIŠNI DIPLOMSKI STUDIJ

Leonarda Vugrin

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, srpanj 2021.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE
SVEUČILIŠNI DIPLOMSKI STUDIJ

Leonarda Vugrin

**Istraživanje mehanokemijskih polimorfni transformacija Ramanovom
spektroskopijom *in situ***

DIPLOMSKI RAD

Voditelj rada: dr. sc. Ivan Halasz

Mentor: prof. dr. sc. Marica Ivanković

Članovi ispitnog povjerenstva:

1. Prof. dr. sc. Marica Ivanković, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Sveučilište u Zagrebu
2. Dr. sc. Ivan Halasz, Institut Ruđer Bošković, Zagreb
3. Prof. dr. sc. Hrvoje Ivanković, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Sveučilište u Zagrebu

Zagreb, srpanj 2021.

Ovaj rad je izrađen na Zavodu za fizičku kemiju Instituta Ruđer Bošković, pod vodstvom dr. sc. Ivana Halasza. Mentor: prof. dr. sc. Marica Ivanković, Zavod za fizikalnu kemiju, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Sveučilište u Zagrebu

ZAHVALA

Veliku zahvalnost iskazujem voditelju dr. sc. Ivanu Halaszu, na pruženom povjerenju i prilici da budem dio istraživačkog tima te steknem iskustvo rada van Fakulteta. Hvala za stručno vodstvo i predstavljanje tematike ovog rada na zanimljiv način. Posebno hvala na posvećenom vremenu, trudu i strpljenju.

Hvala prof. dr. sc. Marici Ivanković na prihvaćenom mentorstvu, pomoći, pristupačnosti i srdačnosti.

Hvala dr. sc. Goranu Miletiću na upoznavanju s računalnom kemijom, nesebično prenesenom znanju i uloženom vremenu.

Hvala ekipi iz labosa na svakoj pomoći, dijeljenju iskustva i korisnim savjetima koje ću pamtiti. Užitek je bio surađivati s predanim ljudima poput Vas.

Najvažnije, hvala obitelji i prijateljima čija je vrijednost nemjerljiva, a bez kojih ne bih ostvarila odlične rezultate i izgradila sebe kao osobu u svakodnevnom životu te naravno i u poslovnom svijetu.

SAŽETAK

Ovaj diplomski rad doprinos je istraživanju mehanokemijskih polimorfnih transformacija. Kao modelni sustav odabran je derivat benzojeve kiseline te njegove transformacije u uvjetima suhog i tekućinom-potpomognutog mljevenja. U kemiji čvrstog stanja mnoga su istraživanja vezana uz temeljne karakteristike polimorfije i faznih prijelaza između polimorfa. Polimorfija je iznimno važna prilikom industrijske proizvodnje čvrstih tvari gdje je bitno da je konačna tvar u određenoj polimorfnoj formi s ciljnim fizikalnim i kemijskim svojstvima. Glavni je predmet tih istraživanja priprava različitih polimorfa te određivanje njihovih svojstava uključujući i njihove relativne stabilnosti. U ovom radu istraživana je utjecaj tekućih aditiva na selektivnost i učinkovitost mehanokemijske pripreme ciljnih polimorfa.

Dobiveni polimorfi 4-nitrobenzojeve kiseline okarakterizirani su pomoću difrakcije rendgenskog zračenja na praškastom uzorku. Utjecaj dodatka malih količina različitih otapala na brzinu i nastanak specifičnog polimorfa istražen je Ramanovom spektroskopijom *in situ*, a kristalne strukture pripremljenih uzoraka identificirane su difrakcijom na prahu. Korištena su otapala različitih polarnosti odnosno različitih proton-donorskih i proton-akceptorskih svojstava. Prilikom mljevenja polaznog derivata benzojeve kiseline uz dodatak teške vode primijećena je izotopna izmjena vodika karboksilne skupine i deuterija stoga je u svrhu potpunije karakterizacije uz polimorfne transformacije paralelno analiziran i deuterijski kinetički-izotopni efekt.

U radu se primjenjuje teorija funkcionala gustoće za optimizaciju struktura i izračun energija odgovarajućih polimorfa s ciljem usporedbe njihove stabilnosti i boljeg razumijevanja eksperimentalno dobivenih rezultata. Uočena je zadovoljavajuća korelacija između rezultata dobivenih računskim metodama i eksperimentalnih podataka što pruža smjernice za daljnje eksperimente i olakšava proučavanje faznih prijelaza odabranog sustava.

Ključne riječi: mehanokemija, polimorfi, benzojeva kiselina, difrakcija, Ramanova spektroskopija

Mechanochemical polymorphic transformations studied by *in situ* Raman spectroscopy

SUMMARY

This work represents a contribution to the research of mechanochemical polymorphic transformations. Using benzoic acid derivatives as model systems, dry and liquid-assisted milling were studied. In solid-state chemistry, fundamental characteristics of polymorphism and their phase transitions have been in the focus of research for decades. Polymorphism is of utmost importance in industrial production of solids where it is essential that the final substance is formulated in the adequate crystalline form having desired physical and chemical properties. The main subject of these studies is the synthesis of different polymorphs and their stability. In this work we have studied the influence of liquid additives on selectivity and efficiency in targeted preparation of polymorphs.

The prepared polymorphs were characterized by using powder X-ray diffraction and Raman spectroscopy. The influence of solvents of different polarities and different proton-donor and proton-acceptor properties on the rates and selectivities of polymorphic transformations was examined using *in situ* Raman spectroscopy, while all the crystal structures were characterised using powder X-ray diffraction data. During the grinding of the starting benzoic acid derivative with the addition of heavy water, an isotopic exchange of hydrogen of the carboxyl group and deuterium was observed.

In this master thesis, density functional theory is applied to optimize the structures and calculate the energies of the corresponding polymorphs with the aim of comparing their stability and better understanding of the experimentally obtained results. A satisfactory correlation was observed between the results obtained by computational methods and experimental data, which provides guidelines for further experiments and facilitates the study of phase transitions of the selected system.

Keywords: mechanochemistry, polymorphism, benzoic acid, X-ray diffraction, Raman spectroscopy

Sadržaj

1. UVOD	1
2. OPĆI DIO	4
2.1. Mehanokemijska sinteza	5
2.2. <i>In situ</i> praćenje mehanokemijskih reakcija	13
2.2.1. Difrakcija rendgenskog zračenja (XRD).....	13
2.2.2. Ramanova spektroskopija	17
2.3. Polimorfija	22
2.3.1. Polimorfi 4-nitrobenzojeve kiseline.....	25
2.4. Kinetički-izotopni efekt	26
2.5. Računalno modeliranje	33
2.5.1. Teorija funkcionala gustoće	33
2.5.2. Ravni valovi i pseudopotencijali	34
3. EKSPERIMENTALNI DIO	35
3.1. Opće napomene.....	36
3.2. Priprava polimorfa 4-nba	37
3.2.1. Priprava polimorfa 4-nba u suhim uvjetima.....	38
3.2.2. Priprava polimorfa 4-nba metodom LAG	38
4. REZULTATI I RASPRAVA	40
4.1. Cilj rada.....	41
4.2. Mehanosinteza polimorfa.....	42
4.2.1. Polimorfi 4-nba	42
4.3. Računalno ispitivanje stabilnosti polimorfa 4-nba.....	56
5. ZAKLJUČAK	62
6. POPIS SIMBOLA	65
7. LITERATURA	67

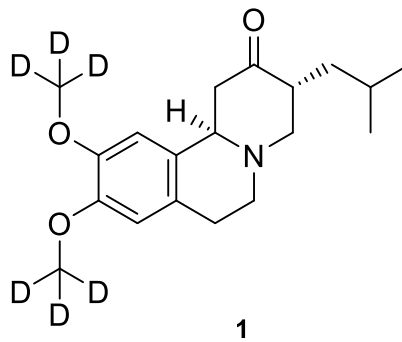
1. UVOD

Mehanokemija kao sintetska metoda ostvaruje važnu ulogu u pripravi novih biološki aktivnih tvari čime se zadovoljavaju sve veći zahtjevi farmaceutske industrije za učinkovitim pristupom organskoj sintezi. Značajan uzrok razvoja mehanokemijske sinteze je sposobnost stvaranja ili razgradnje molekulskih kokristala, polimorfa i soli bez korištenja velikih količina otapala što odgovara standardima zelene kemije te daje doprinos znatnom smanjenju uporabe organskih otapala u proizvodnji lijekova i drugih materijala.¹

Uz ekološku prihvatljivost, reakcije u čvrstom stanju izrazito su povoljne i radi zadovoljavajućih iskorištenja zbog čega imaju veliku primjenjivost u farmakološkim ispitivanjima. Prilikom sinteze, a potom i formulacije farmaceutski aktivnih tvari bitna je kontrola uvjeta koji potencijalno dovode do transformacije materijala iz jednog kristalnog oblika u drugi. Različiti kristalni oblici nazivaju se polimorfima i čine značajno područje kristalnog inženjerstva koje, između ostalog, stremi predviđanju i razumijevanju čimbenika koji utječu na polimorfiju. Primjerice, lijek za kontrolu razine šećera u krvi, tolbutamid prisutan je u dva različito stabilna polimorfna oblika čija se priprava može provesti mljevenjem i kontrolirati ovisno provodi li se sinteza u suhom stanju ili uz dodatak tekućine.² Raznim istraživanjima u području kristalnog inženjerstva pokazalo se da je primjenom mehaničke energije moguće izmijeniti fizikalno-kemijska svojstva poput stabilnosti i topljivosti uz zadržavanje reaktivnosti aktivne komponente. S obzirom na to da inducirane transformacije mogu znatno utjecati na djelotvornost i sigurnost lijeka, tijekom razvoja potencijalnog lijeka temeljito se istražuju kristalne forme aktivne tvari. Predvidljivost u postojanju polimorfa i dalje predstavlja izazov, jer istraživači pristupaju svijetu višestrukih kristalnih oblika s tradicionalnim tehnikama: iskustvom, znanjem i metodom slučajnog otkrivanja s pozitivnim ishodom. Značajan napredak u pogledu izravnih praćenja mehanokemijskih polimorfni transformacija ostvaren je razvojem instrumentalnih analitičkih metoda poput Ramanove spektroskopije *in situ* čime je otvoren put za kemijsku zelenu revoluciju.

Kontroliranjem reakcijskih uvjeta moguće je precizno usmjeriti reakciju prema specifičnoj polimorfnoj formi te na taj način pripremiti spoj s željenim karakteristikama. Osim manipulacijom polimorfije, svojstva ciljnog spoja moguće je unaprijed definirati i regulirati uvođenjem deuterija. Sposobnost istodobnog praćenja polimorfni modifikacija te izotopne zamjene vodika i deuterija uvelike olakšava upravljanje sintezom. Istraživanje polimorfni formi kokristala temeljenih na deuteriranim polazišnim gradivnim blokovima postalo je od velikog interesa u području farmakologije zbog poboljšanja farmakološkog profila postojećih lijekova. Na primjer, farmaceutska tvrtka Teva razvila je prvi deuterirani lijek Austedo®

(deutetrabenazin) za liječenje kronične, neurodegenerativne Huntingtonove bolesti pri čemu se deuteracijom proširio opseg djelovanja nedeuteriranog analoga tetrabenazina (Slika 1). Mehanizam djelovanja navedenog lijeka odnosi se na blokiranje monoaminskog transportera-2 (VMAT-2) za dopamin, serotonin, noradrenalin i histamin u mozgu čime se smanjuje njihov unos u sinaptičke vezikule, a posljedično time i učestalost depresivnih simptoma.



Slika 1. Molekulska struktura aktivne tvari lijeka Austedo.³

2. OPĆI DIO

2.1. Mehanokemijska sinteza

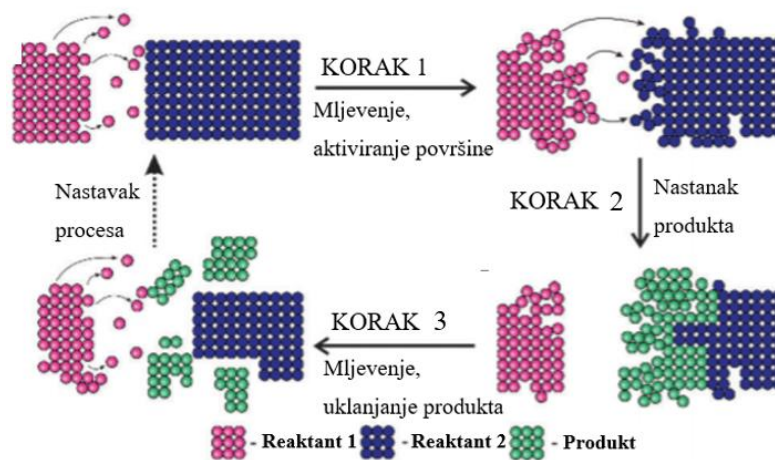
Zadnjih nekoliko desetljeća mehanokemija je prepoznata kao ekološki isplativa i održiva alternativa tradicionalnoj kemijskoj sintezi koja se provodi u otopinama. Širenje istraživačkog interesa za provođenje reakcija u čvrstom stanju proizlazi iz potrebe za čistim, jednostavnijim, sigurnijim i učinkovitijim kemijskim sintetskim procesima. Mehanokemija je staro područje, ali koje je veći dio povijesti bilo na margini. Odnedavno se sve više širi i dobiva na važnosti posebno radi izvrsnih rezultata u stvaranju nekovalentnih interakcija poput vodikovih, halogenih i metal-ligand kordinacijskih veza. Mehanokemija izvrsno ispunjava principe zelene kemije, i to ne samo zato što smanjuje probleme s otpadnim otapalima, već omogućava kontrolirano dobivanje ciljnih spojeva uz manje nusprodukata, smanjuje potrošnju energije, a često omogućava i kraća vremena reakcija.⁴ Međutim, potrebno je naglasiti kako mehanokemija nije rješenje za sve sintetske probleme, jer se određeni spojevi mogu pripremiti samo konvencionalnim metodama.

Prema IUPAC-ovoj definiciji, mehanokemijska se reakcija odnosi na kemijsku reakciju izazvanu izravnom apsorpcijom mehaničke energije koja se u sustav unosi mehaničkim djelovanjem. Međutim, postoje razne rasprave o danoj definiciji, jer neki znanstvenici smatraju da je to grana kemije čvrstih tvari gdje se intramolekularne veze mehanički kidaju što je ujedno i prvi korak kemijskih transformacija.⁵ Rezultati mehaničkog djelovanja su smanjenje veličine čestica, nastanak aktivnih mjesta putem nastanka novih defekata te aktivne površine nužne za kemijsku reaktivnost pri čemu se čestice međusobno sudaraju, spajaju i reagiraju.⁶ Transformacije organskih molekula mogu se opisati putem trostupanjskog Kauppovog modela koji uključuje aktivaciju krutih reaktanata, njihovu reakciju i kristalizaciju produkta (Slika 2).⁷ Pritom se prijenos mase ostvaruje kroz tekuću, krutu ili plinovitu fazu ili bilo koju njihovu kombinaciju. Na Slici 2 prikazano je kako mehanokemijska transformacija započinje difuzijom reaktanata kroz mobilnu fazu pri čemu njihova interakcija rezultira kemijskom promjenom. Potom slijedi nukleacija i rast faze produkta te odvajanje produkta radi stvaranja nove, reaktivne površine. Tri općenita mehanizma uzimaju u obzir molekularni transport na površinama kristala putem plinovite faze ili glavnine kristala, stvaranje eutektičkih tekućih međufaza i reakcije putem prijelazne, amorfne međufaze. Prvi se mehanizam odnosi na molekule koje imaju visok tlak para te su slabo vezane u kristalnoj rešetci dok je drugi mehanizam vezan uz reaktante s niskim talištem. Treći mehanizam povezan je s molekulama koje su snažno vezane unutar

kristalne rešetke primjerice vodikovim vezama. Naime, mehanizmi mehanokemijskih procesa su složeni i ne mogu se opisati koristeći samo jednu vrstu mehanizma već je najvjerojatniji istovremeni doprinos.⁵ Upravo je za uspješnost reakcije potrebno povećati površinu reaktanata i smanjiti put koji molekula mora proći kroz medij procesom difuzije.

Glavni čimbenici koji utječu na reakcije u čvrstom stanju mogu se sažeti na sljedeći način:

1. Čvrste se tvari moraju prije svega dovesti u kontakt (Slika 2, korak 1).
2. Kada se kontakt ostvari pojavljuju se promjene na granici faza poput lokalne promjene temperature, napreznja, formiranja vodikovih veza, polarizacije i prijenosa naboja (korak 2 i 3).



Slika 2. Shematski prikaz mehanizma mehanokemijskih transformacija tijekom mljevenja.⁷

Na pitanje kako molekule tijekom mljevenja primaju energiju potrebnu za kemijsku reaktivnost dana su mnoga objašnjenja i teorije. Teorija vrućih žarišta (eng. *hot-spot theory*) predviđa stvaranje lokaliziranih, kratkotrajnih žarišta gdje se procjenjuje da temperatura poraste i do nekoliko tisuća kelvina na uzorku površine od $1 \mu\text{m}^2$ u vremenskom periodu od 10^{-3} do 10^{-4} s. U žarištima reaktanti imaju dovoljno energije za prelazak energijske barijere i formiranje produkta. Druga teorija kojom se opisuje tijek reakcije u mehanokemijskim uvjetima je tzv. magma-plazma model (eng. *magma-plasma model*). Navedeni model temelji se također na sudarima kuglica te kuglica i stijenke pri čemu pretpostavlja još višu temperaturu na mjestima sudara te nastajanje kratkoživuće plazme koja omogućava izbacivanje visokoenergetskih čestica poput slobodnih elektrona i fotona. Naime, nekoliko studija ukazuju kako su transformacije u mlinu izravnije zbog čega se nastoji manipulirati energetske barijere mijenjanjem radnih frekvencija te time utjecati na ishod reakcije. Određena su istraživanja uspješna povezati parametre kugličnog mljevenja s Arrheniusovom jednačinom pri čemu je

kolizijski faktor A proporcionalan radnoj frekvenciji mlina, a energetski se faktor odnosi na Boltzmanovu raspodjelu energije ovisno o temperaturi posude. Primjerice, Mack i suradnici pokazali su kako je kuglično mljevenje energetski povezano s Arrheniusovom jednadžbom te da podešavanje frekvencije izravno utječe na kinetiku i ishod reakcije.⁵

Mehanokemijski postupci mogu se prepoznati već u tehnologiji kamenog doba kad se pojavljuje uporaba tarionika i tučka kao univerzalnog alata brojnih kultura širom svijeta. Unatoč jednostavnosti i sveprisutnosti tarionika i tučka, radi bolje reproducibilnosti i jačeg mehaničkog djelovanja, za provođenje mehanokemijskih reakcija koriste se automatizirani električni mlinovi. Izolirani i zatvoreni reakcijski sustavi omogućuju dulje vrijeme reakcije čime se postiže odgovarajuća veličina čestica kao i bolja reproducibilnost i kontrola unosa mehaničke energije u mljeveni sustav izborom parametara mljevenja. Reakcijska posuda sa smjesom čvrstih reaktanata te kuglicama za mljevenje postavlja se u mlin gdje se podešavanjem frekvencije oscilacija posude ili brzine njene rotacije te vremena trajanja reakcije omogućuje pokretanje i odvijanje kemijske reakcije.

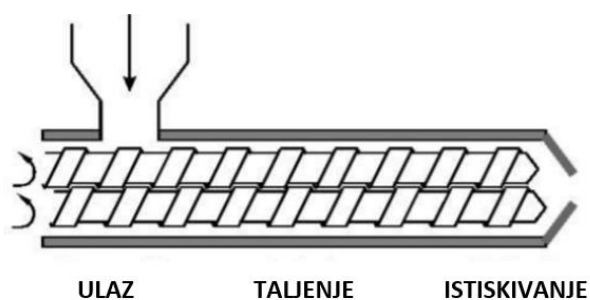
Dvije su osnovne vrste kugličnih mlinova, laboratorijski vibracijski i planetarni (Slika 3). Korištenjem vibracijskih odnosno oscilirajućih mlinova, reakcijska posuda oscilira najčešće u horizontalnoj ravnini s jedne na drugu stranu frekvencijom do 36,0 Hz. Pritom dolazi do sudara kuglice i stijenke, a materijal koji se nađe između tijekom sudara prima mehaničku energiju. Osim sudara, značajno je i struganje reaktanata o površinu posudice te samo miješanje reaktanata. Kinetička energija kuglica i posude prilikom neelastičnih sudara djelomično prelazi u unutrašnju energiju sustava što dovodi do zagrijavanja posudica. Vibracijski mlin uglavnom prima po dvije posude koje se pune kuglicama različitih dimenzija ovisno o volumenu posude za mljevenje. Intenzitet miješanja povećava se korištenjem većeg broja kuglica manjeg promjera dok se energija koja se prenosi na sustav putem sudara povećava odabirom kuglica veće mase. Odabir broja i veličine kuglica ovisit će o samom sustavu kojeg se podvrgava mljevenju.

S druge strane, u visokoenergetskim planetarnim mlinova reakcijske posude rotiraju se oko svoje osi određenom brzinom pri čemu se kao planetarni sustav okreću na disku koji se također okreće oko svoje osi. Vibracijski mlinovi koriste se za pripremu spojeva i materijala do skale od približno 1 g, dok planetarni mlinovi mogu ići do skale od čak 1 kg. Osnovna vrsta sile u vibracijskom mlinu je udarna, dok je u planetarnom osnovna sila smična.



Slika 3. Razlika između vibracijskog i planetarnog mlina.^{8,9}

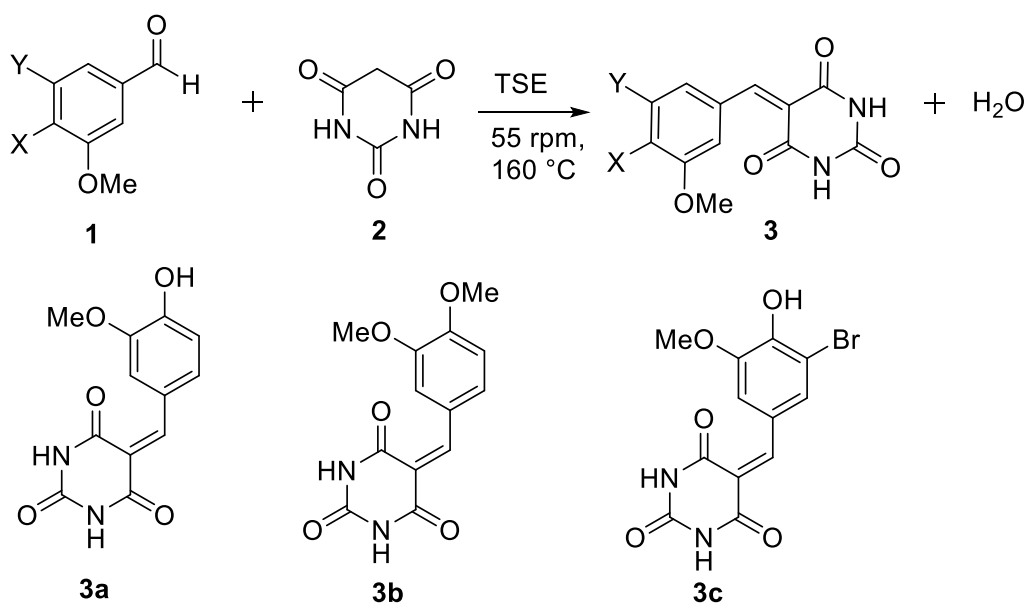
Osim vibracijskog i planetarnog mlina, među novijim mehanokemijskim alatima pojavljuje se dvovijčani ekstruder (TSE, eng. *twin-screw extruder*). Rješenje za industrijsko povećanje mehanokemije je TSE sustav kojim je omogućena kontinuirana sinteza kokristala te metalo-organskih mreža u količinama od više kilograma po satu. Određene se reakcije izvode u odsutnosti otapala, a nusproizvod voda uklanja se u obliku vodene pare tijekom postupka istiskivanja zbog korištenih povišenih temperatura.¹⁰ U navedeni se sustav kruti reagensi dodaju i melju, dok se smjesa transportira duž puta ekstrudera pomoću rotirajućih vijaka. Različiti dijelovi i zone vijaka omogućuju pritom različita mehanička djelovanja (Slika 4). Prilikom ekstruzije najvažniji parametri su temperatura i tlak, brzina vrtnje vijaka, kapacitet ekstrudera te specifični utrošak energije.



Slika 4. Presjek dvopužnog ekstrudera i osnovne zone punjenja, stlačivanja i istiskivanja.¹¹

Nekoliko studija opisuje primjenu TSE za pripravu kokristala važnog farmaceutskog značaja. Kaupp i suradnici po prvi put su istražili Knoevenagelovu kondenzaciju aromatskog aldehida,

vanilina i barbiturne kiseline u čvrstom stanju pomoću TSE sustava proširivši reakciju barbiturne kiseline s veratraldehidom i 5-bromvanilinom (Shema 1). Reaktant s najnižim talištem te aldehidi koji sadrže elektron-donorske supstituente u *para* položaju u odnosu na karbonilnu skupinu prvi su reagirali. Reakcija vanilina i barbiturne kiseline u potpunosti je bila gotova nakon 60 min, a uz veratraldehid nakon 90 min s iskorištenjem od 100%.¹⁰ Zaključno, razne reakcije kondenzacije mogu se provesti u povećanom mjerilu mehanokemijskim putem, kontinuirano i bez dodatka otapala.



Shema 1. Reakcija tri različita aldehida s barbiturnom kiselinom u čvrstom stanju uz pomoć TSE.¹⁰

Medij za mljevenje i kuglice koje se koriste izrađuju se u raznim veličinama i od raznih materijala poput čelika, volframovog karbida, aluminijskog oksida, ali i plastičnih materijala poput poli(metil-metakrilata) ili teflona. Građivni materijali razlikuju se u gustoći, tvrdoći i kemijskoj otpornosti stoga je to bitan parametar za kontrolu unosa mehaničke energije u sustav te time i reaktivnosti. Primjerice, ukoliko se mljevenje odvija korištenjem kuglica od volframovog karbida postiže se puno veća kinetička energija nego upotrebom teflonskih kuglica čija je gustoća puno manja ($\rho_{WC} = 15,8 \text{ g/cm}^3$, $\rho_{teflon} = 2,2 \text{ g/cm}^3$). Nadalje, kemijska svojstva posude i kuglica moraju biti kompatibilne s kemijskim svojstvima mljevenog materijala na način da ne dolazi do reakcije između materijala posude i reakcijske smjese. Tako su posude od nehrđajućeg čelika neprikladne ako je u smjesi prisutna jaka kiselina. Osim toga, prilikom dugotrajnog mljevenja, moguće je i trošenje materijala te zagađenje reakcijske smjese materijalom posude. Stoga, mediji za mljevenje građeni od kemijski otpornih materijala poput

teflona rješavaju navedeni problem, ali su mekši te je prijenos mehaničke energije kod njih uglavnom niži. Jedna od vizija mehanokemije uključuje posude presvučene imobiliziranim kiralnim katalizatorima za enantioselektivne reakcije bez potrebe za regeneracijom katalizatora.

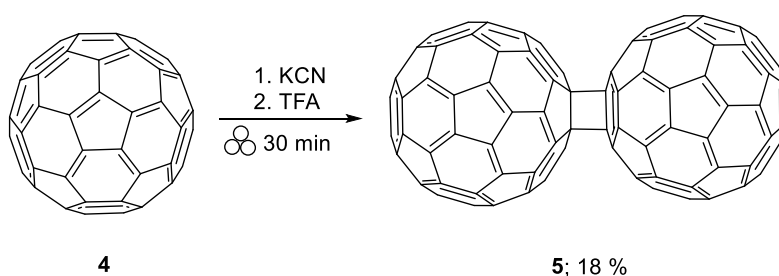
Osnovni je postupak za provedbu mehanosinteze suho mljevenje (NG, eng. *neat grinding*). Uvjeti mljevenja utječu na svojstva mljevenog praha zbog čega je važno razumijeti varijable procesa mljevenja i svojstva produkta. Tri su glavne varijable koje utječu na provedbu reakcija: kinetička energija kuglica i prijenos energije na reagense prilikom sudara te frekvencija sudara. Odnos mase kuglica i dodanih reaktanata bitan je parametar koji je potrebno uzeti u obzir tijekom mljevenja, a definira se kao zbroj masa kuglica u mediju podijeljena s ukupnom masom reaktanata. Faktor koji optimizira određenu kemijsku reakciju je radna vibracijska frekvencija ili brzina vrtnje mlinova čime se omogućuje manipulacija i ponovljivost u raznim uvjetima reakcije.

Primjena mehanokemije proširena je korištenjem malih količina raznih tekućina kao aditiva koje u brojnim slučajevima ubrzavaju ili čak omogućavaju kemijsku reakciju te selektivno usmjeravaju nastanak određenog produkta, što može biti i kristalizacija određenog polimorfa. Takav način sinteze naziva se tekućinom-potpomognutim mljevenjem (LAG, eng. *liquid-assisted grinding*). Primjerice, suho mljevenje kofeina ili teofilina s L-vinskom kiselinom ne dovodi do potpune reakcije, ali 20 min mljevenja u prisutnosti bilo koje od 25 odabranih različitih tekućina daje očekivane kokristale u kvantitativnom iskorištenju.¹² Mehanokemijska tehnika LAG posebno je uspješna u stvaranju novih polimorfa i kokristala aktivnih farmaceutskih supstancija (API, eng. *active pharmaceutical ingredient*). Primjerice, lijekovi u kojima je metalni ion biološki aktivna komponenta i metalofarmaceutici kod kojih metalni ion ostvaruje ulogu nosača API-ja uspješno se priređuju tekućinom-potpomognutim mljevenjem. Široko poznati primjeri metalofarmaceutika su platinski kompleksi koji se koriste u liječenju karcinoma poput cisplatina, karboplatina i oksaliplatina.¹² Tekućina ne mora biti dodana u obliku tekućine nego može biti prisutna i u obliku hidratiziranih soli metala, solvata ili može nastati tijekom same reakcije.

Kod reakcija LAG, količina dodane tekućine iskazuje se parametrom η koji se izračunava kao omjer volumena dodane tekućine (izražene u μL) i ukupne mase reagensa (izražene u mg). Kod sinteze bez prisutnosti otapala η iznosi 0 dok je kod sinteze uz dodatak tekućine uglavnom u rasponu 0–1 $\mu\text{L}/\text{mg}$. Ovisno o termodinamičkoj ili kinetičkoj stabilnosti, dodatkom tekućine

mogu nastati različiti produkti. Pokazalo se da se pomoću različitih vrsta tekućine, ali i različitih količina iste tekućine, mogu pripremiti različiti polimorfi. Tako su primjerice, Trask *et al.* proveli mljevenje polimorfa *o*-aminobenzojeve kiseline s polarnim i nepolarnim otapalima te su uočili selektivnost prema različitim polimorfima ovisno o uporabljenoj tekućini.¹³ Unatoč brojnim opažanjima o utjecaju tekućine na ishod mljevenja, teško je predvidjeti kako će izbor pojedine tekućine utjecati na dobivanje pojedinog polimorfnog oblika. Dodatne tehnike mljevenja su mljevenje potpomognuto jednostavnim ionskim spojevima uz tekućinu (ILAG, eng. *ion- and liquid-assisted grinding*) ili parom (VAG, eng. *vapour-assisted grinding*) te uz pomoć polimera (POLAG, eng. *polymer-assisted grinding*).

U Tablici broj 1 prikazane su četiri kemijske reakcije provedene mehanokemijskim putem koje pokazuju niz prednosti u odnosu na konvencionalne sintetske metode. Iz danih primjera vidljivo je kako se odgovarajućom kontrolom temperature i podešavanjem adekvatne frekvencije smanjuje vrijeme reakcije, potreba za korištenjem toksičnih otapala te se postižu visoka iskorištenja. Također, primjer reakcije koju nije moguće provesti u otopini, a mehanokemija pruža rješenje prikazan je na Shemi 2. Naime, zbog jedinstvenih elektroničkih i strukturnih svojstava fulerena postoji niz istraženih metoda za njihovu funkcionalizaciju. Kmatsu i suradnici razvili su prvu metodu za sintezu dimera fulerena, C₁₂₀ pomoću vibracijskog mlina u kratkom vremenu od 30 min s iskorištenjem od 18%. Za sintezu se koristio kalijev cijanid koji se može zamijeniti i drugim reagensima poput K₂CO₃ i KOAc. Dodatno, pokazalo se da je moguće dobiti fulerenski trimer C₁₈₀ kada se 4-aminopiridin koristi kao katalizator.⁸



Shema 2. Prikaz mehanosinteze dimera fulerena C₆₀.⁸

Tablica 1. Usporedba mehanokemijskih i konvencionalnih reakcija.^{8,9}

KONVENCIONALNI PRISTUP	MEHANOKEMIJSKI PRISTUP
<p> $\text{Mes-N} \begin{array}{c} \diagup \\ \diagdown \end{array} \text{N}^+ \text{Mes} \xleftarrow[8\text{h}, 100\text{ }^\circ\text{C}]{5\text{ ekviv. Cu (0)}} \text{Mes-N} \begin{array}{c} \diagup \\ \diagdown \end{array} \text{N}^+ \text{Mes} \xrightarrow[8\text{h}]{5\text{ ekviv. Cu (0)}} \text{Mes-N} \begin{array}{c} \diagup \\ \diagdown \end{array} \text{N}^+ \text{Mes} \text{Cl}^-$ 19 % </p>	<p> $\text{Mes-N} \begin{array}{c} \diagup \\ \diagdown \end{array} \text{N}^+ \text{Mes} \xrightarrow[8\text{h}]{5\text{ ekviv. Cu (0)}} \text{Mes-N} \begin{array}{c} \diagup \\ \diagdown \end{array} \text{N}^+ \text{Mes} \text{Cl}^-$ 80 % </p>
<p> $\text{Benzene} + \text{Quinone} \xrightarrow[3\text{ h}]{\text{ksilen, refluks}}$ </p>	<p> $\text{Benzene} + \text{Quinone} \xrightarrow[3\text{ h}]{18\text{ Hz, }120\text{ }^\circ\text{C}}$ </p>
<p> $\text{Ar}^1\text{-C}\equiv\text{C-R} \xleftarrow[72\text{ h}]{2,5\% \text{ CuPF}_6(\text{MeCN})_2, 5\% \text{ L} / 10\% \text{ Boc-prolin, CH}_2\text{Cl}_2\ 0\text{ }^\circ\text{C}}$ </p>	<p> $\text{Ar}^1\text{-C}\equiv\text{C-R} \xrightarrow[30-60\text{ min}]{5\% \text{ L} / \text{Cu(OTf)}_2}$ </p>
<p> $\text{Ar}^1\text{-C}\equiv\text{C-R} \xleftarrow[2) \text{ THF} / 8-12\text{ h} / 50\text{ }^\circ\text{C}]{1) \text{ NaH, THF} / 1\text{ h}}$ </p>	<p> $\text{Ar}^1\text{-C}\equiv\text{C-R} \xrightarrow[1-2\text{ h, }1\text{ mL EtOH}]{\text{K}_2\text{CO}_3, 18\text{ Hz}}$ </p>

U području mehanokemije postoji mnogo ograničenja, poput komercijalne nedostupnosti, nemogućnosti praćenja i precizne kontrole temperature *in situ* stoga se radom na ovim nedostacima otvara put za ostvarivanjem napretka. Na temelju sve većeg rasta broja objavljenih članaka na temu mehanokemije postaje jasno kako ova nekada nejasna disciplina ostvaruje potencijal da postane vodeća struja znanstvenika koje zanima poboljšana laboratorijska sigurnost te jednostavniji postupci koji omogućuju učinkovito korištenje vremena.

2.2. *In situ* praćenje mehanokemijskih reakcija

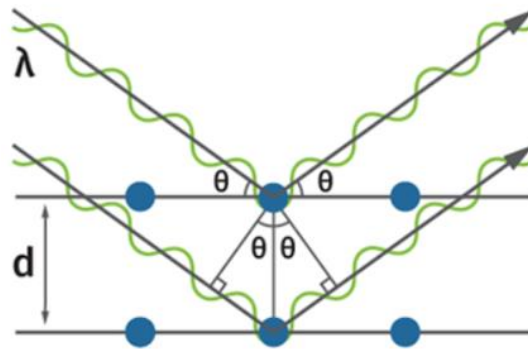
2.2.1. Difrakcija rendgenskog zračenja (XRD)

Učinkovitost mehanokemijskih reakcija povećana je uporabom praćenja reakcija *in situ* čime se uklonila potreba za periodičnim zaustavljanjem procesa mljevenja radi uzorkovanja reakcijske smjese. Jedna od tehnika kojom je moguće pratiti tijek reakcije u realnom vremenu je difrakcija rendgenskog zračenja.

Rendgenska difrakcija (eng. *X-ray diffraction*, XRD) jedinstvena je tehnika koja se koristi za kvalitativnu i kvantitativnu faznu analizu, određivanje kristalne strukture, određivanje parametara jedinične ćelije te istraživanje polimorfije.¹⁵ Rendgensko zračenje je elektromagnetsko, ionizirajuće zračenje valne duljine u području između 10 i 0,01 nm. Laboratorijski izvor rendgenskog zračenja je tzv. rendgenska cijev koja je evakuirana kako bi se spriječila kolizija elektrona te nastalih rendgenskih zraka sa molekulama u zraku. Za anodu se koriste različiti metali, najčešće bakar i molibden, dok se katoda izrađuje najčešće od volframa zbog njegovog visokog tališta i dobre termičke vodljivosti.¹⁶ Spektar rendgenskog zračenja iz rendgenske cijevi sastoji se od kontinuiranog i karakterističnog dijela pri čemu karakteristični spektar nastaje uslijed elektronskih prijelaza u atomima anode te se stoga nalazi pri točno određenim valnim duljinama i karakterističan je za metal od kojeg je načinjena anoda. Zbog navedenih svojstava, karakteristični se spektar koristi u rendgenskoj difrakciji, a kako bi se odvojio kontinuirani spektar koriste se filteri ili monokromatori.

Metodu za karakterizaciju kristalne strukture pomoću difrakcije rendgenskih zraka razvili su William Henry Bragg i njegov sin William Lawrence Bragg. Na temelju koncepta ekvidistantnih ravnina na kojima atomi leže u kristalnoj rešetci, definirali su uvjet konstruktivne interferencije zraka rendgenskog zračenja reflektiranih s dviju sukcesivnih ravnina. Plohe odnosno ravnine na kristalu označavaju se Millerovim indeksima (*hkl*) kao recipročne vrijednosti presjecišta ravnine i jediničnih osi. Dakle, ploha koja ima Millerov indeks siječe os *x* u $1/h$, os *y* u $1/k$, i os *z* u $1/l$.¹⁷ Do difrakcije zračenja dolazi samo ako je zadovoljena Braggova jednadžba pri čemu zračenje valne duljine λ pada pod kutem θ na mrežne ravnine indeksa *hkl* razmaknute za međumrežni razmak *d* (Slika 5).

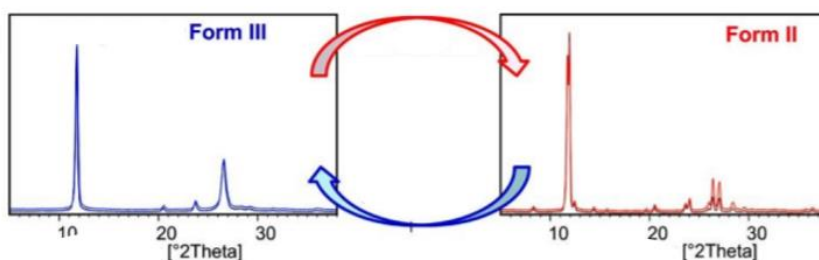
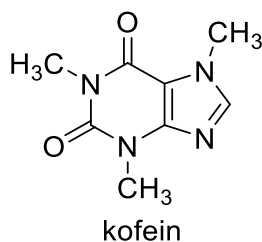
$$n\lambda=2d\sin\theta \quad (1)$$



Slika 5. Princip difrakcije rendgenskih zraka na kristalu.^{18,19}

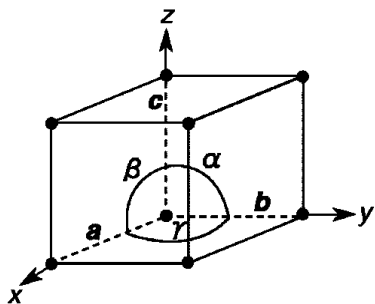
Naime, na pravilnoj trodimenzionalnoj kristalnoj strukturi, svaki atom raspršuje rendgensko zračenje u svim smjerovima tako da svaka ravnina djeluje poput djelomično transparentnog zrcala te dio zraka reflektira dok dio propušta. Intenzitet raspršenih rendgenskih zraka je funkcija broja elektrona atoma na kojem dolazi do raspršenja kao i valne duljine zračenja. Na intenzitet rendgenskih zraka utječe polarizacija rendgenskih zraka, geometrija instrumenta, termičke vibracije te na posljetku preferirana orijentacija kristala.¹⁷

Ovisno o tome kakav je uzorak, istraživanja se dijele na metodu monokristala i metodu praha koja podrazumijeva uzorak koji se sastoji od bezbroj čestica pravilne unutrašnje građe. Najčešće se za rendgensku difrakcijsku analizu koristi polikristaliničan praškasti uzorak odnosno metoda praha. Navedenu metodu karakterizira rotacija uzorka oko osi koja je okomita na upadno zračenje te istovremeno okretanje detektora dvostrukom kutnom brzinom u odnosu na uzorak. Drugim riječima, uzorak s primarnim snopom zraka zatvara kut θ , a detektor zatvara kut 2θ . Ukupno zračenje koje se registrira na detektoru funkcija je vremena odnosno koliko dugo je određena ravnina u položaju pogodnom za difrakciju. Navedeno opisuje Lorentzov faktor koji ovisi o divergenciji ulazne zrake te broju kristalita koji su povoljno orijentirani za difrakciju. Kao rezultat dobiva se difraktogram, ovisnost intenziteta difraktiranih zraka odnosno broj impulsa (broj difraktiranih fotona rendgenskog zračenja) u ovisnosti o kutu (Slika 6). Difraktogram kristalne faze je poput otiska prsta, jer određena kristalna tvar uvijek daje isti difraktogram. Neki se kemijski spojevi pojavljuju u više kristalnih struktura odnosno polimorfni modifikacija. Sastav takvih spojeva je isti, ali zbog različite strukture njihovi se difraktogrami razlikuju.



Slika 6. Utjecaj polimorfije na difrakcijsku sliku.²⁰

Dvije glavne karakteristike difraktograma su intenzitet i položaj točaka difrakcije. Kako bi prilikom detekcije kristalne strukture intenziteti bili usporedivi potrebno je apsolutne preračunati u relativne intenzitete budući da oni ne ovise o instrumentu. Iz položaja se određuje oblik i veličina elementarne ćelije pri čemu se indeksiranjem mogu dobiti podaci potrebni za određivanje prostorne grupe. Naime, elementarna ćelija kao osnovni strukturni motiv definirana je parametrima jedinične ćelije, duljinama bridova (a , b i c) te kutovima (α , β i γ) između njih (Slika 7). Postoji 7 kristalnih sustava (kubični, tetragonski, rompski, monoklinski, triklinski, heksagonski i romboedarski (trigonski), a ako se uzme u obzir centriranost jedinične ćelije postoji četrnaest različitih vrsta ćelija u periodičnom ponavljanju u trodimenzionalnom prostoru. Dodatno, za određenu kristalnu strukturu koja posjeduje elemente simetrije moguće je provesti sljedeće operacije: inverziju, rotaciju te zrcaljenje ili refleksiju. Centar simetrije odnosi se na točku u centru elementarne ćelije kroz koju je moguće projekcijom svih točaka replicirati osnovni motiv. Kristalografske točkaste grupe su grupe koje sadrže elemente simetrije kojima se može operirati na beskonačnoj trodimenzionalnoj rešetci, a navedenim zahtjevima udovoljavaju 32 grupe. Prostorne su grupe kombinacija točkastih grupa i Bravaisovih rešetki odnosno makroskopskih i mikroskopskih elemenata simetrije pri čemu postoji 230 različitih prostornih grupa. Za neku kristalnu fazu za strukturni opis navodi se simbol prostorne grupe, dimenzije jedinične ćelije i koordinate atoma u ćeliji. Svih 230 prostornih grupa tabelirano je u *International Tables for X-ray Crystallography*.²¹



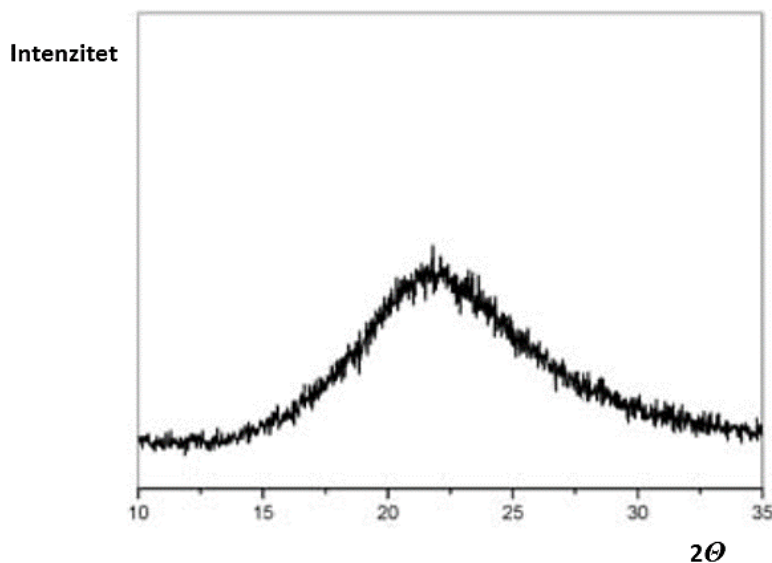
Crystal system	Point group	Space groups			
triclinic	1 $\bar{1}$	P1 $P\bar{1}$			
monoclinic	2 m 2/m	P2 Pm P2/m P2 ₁ /c	P2 ₁ Pc P2 ₁ /m C2/c	C2 Cm C2/m	Cc P2/c
orthorhombic	222	P222 C222 ₁ I2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	P222 ₁ C222	P2 ₁ 2 ₁ 2 F222	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁ I222
	mm2	Pmm2 Pca2 ₁ Pna2 ₁ Ccc2 Aba2 Iba2	Pmc2 ₁ Pnc2 Pnn2 Amm2 Fmm2 Ima2	Pcc2 Pmn2 ₁ Cmm2 Abm2 Fdd2	Pma2 Pba2 Cmc2 ₁ Ama2 Imm2
	mmm	Pmmm Pmma Pbam Pmnn Cmcm Cmma Immm	Pnna Pccn Pbcn Cmca Ccca Ibam	Pccm Pmna Pbcm Pbca Cmmm Fmmm Ibca	Pban Pcca Pnna Pnma Cccm Fddd Imma

Slika 7. Načini obilježavanja parametara elementarne ćelije te prostornih grupa.^{22,23}

Prilikom rješavanja kristalne strukture, potrebno je unijeti CIF (eng. *crystallographic information file*) datoteku koja sadrži kristalografske informacije poput prostorne grupe i parametara jedinične ćelije te na temelju navedene datoteke uskladiti eksperimentalno dobivenu difrakcijsku sliku s izračunatom. Usklađivanje se provodi pomoću računalnog programa TOPAS, variranjem parametara jedinične ćelije i strukturnih parametara pomoću Rietveldove metode. Cilj je ostvariti minimalizaciju izračunatog i eksperimentalnog difraktograma što se postiže metodom najmanjih kvadrata, a kvaliteta se iskazuje kao gof (eng. *goodness of fit*).

$$gof = \frac{R_{wp}}{R_{exp}} \quad (2)$$

Faktor slaganja, R_{wp} opisuje kvalitetu slaganja između izračunatog i izmjenog difraktograma.²⁴ Difraktogram savršeno uređenog i beskonačno velikog kristala teoretski bi sadržavao beskrajno uske linije. Međutim, u realnosti on se sastoji od pikova koji imaju određenu širinu. Važno je naglasiti kako se difraktometrija praha koristi za identifikaciju kristalnih faza, dok će se amorfne faze uočiti iz pojave širokog i slabog maksimuma (Slika 8).



Slika 8. Difraktogram amorfne faze SiO₂.²⁵

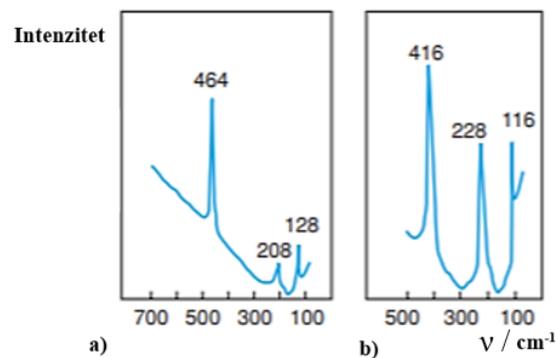
2.2.2. Ramanova spektroskopija

Primjena mehanokemijskih reakcija ubrzano se širi, ali s druge strane razumijevanje fizikalno-kemijskih procesa i dalje je u stagnaciji. Ulažu se značajni naponi u shvaćanje kako parametri poput temperature, frekvencije mljevenja ili omjera mase uzorka i mase kuglica za mljevenje utječe na tijek organskih reakcija. Ključan iskorak ostvaren je uvođenjem tehnika za *in situ* praćenje procesa mljevenja, prvotno difrakcijom rendgenskog zračenja, a potom i Ramanovom spektroskopijom te tandemsom tehnikom koja ih rabi istovremeno. Mehanokemijske reakcije odvijaju se u zatvorenim čeličnim posudama, a primjenom Ramanove spektroskopije *in situ* mogu se dobiti informacije o mehanizmu reakcija kao i detektirati intermedijeri i konačni produkti. Budući da je difrakcija rendgenskog zračenja ograničena na kristalinične uzorke, Ramanova spektroskopija može biti osobito korisna, jer daje informaciju o uzorku bez obzira na njegovu kristaliničnost ili agregacijsko stanje.

Ramanova spektroskopija temelji se na osvjetljavanju uzorka monokromatskim laserskim svjetlom. Pritom dolazi do pojave elastičnog Rayleighovog i neelastičnog Ramanovog raspršenja. Ramanovo raspršeno zračenje mali je dio od ukupno raspršenog zračenja. Kod Rayleighovog raspršenja ne mijenja se energija zračenja dok se kod Ramanovog mijenja te uzorak daje sebi karakterističan Ramanov spektar.²⁶ Ramanov spektrometar sastoji se od izvora zračenja odnosno lasera najčešće ionskog, Ar ili Kr, zatim ćelije za uzorak, selektora valnih

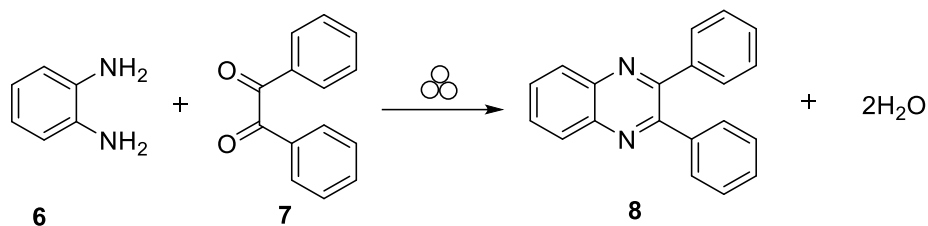
duljina, detektora i sustava za procesiranje signala. Raspršeno se zračenje mjeri pod kutom od najčešće 90° prema upadnom zračenju. Izbor valne duljine izvora posebno je važan radi postizanja velikih intenziteta Ramanovih linija uz što manji fotoraspad uzorka, fluorescenciju i apsorpciju. Selektori ostvaruju ulogu odvajanja relativno slabog Ramanovog od Rayleighovog raspršenog zračenja te moraju postizati adekvatnu rezoluciju. Kao detektori najčešće se koriste fotomultiplikatorske cijevi.

Zanimljiv je primjer upotrebe laserske Ramanove spektroskopije za kristalne čvrste tvari koje se razlikuju u svojoj kristalnoj strukturi, ali ne i u kemijskom sastavu. Na Slici 9 uočava se razlika u spektrima između dva polimorfa silicijevog dioksida, kvarca i kristobalita. U području između 100 i 500 cm^{-1} , svaki polimorf daje tri oštra signala, ali na različitim položajima. Upravo su se ove razlike primjerice, koristile u analizi pepela iz vulkanske erupcije Mount St. Helens u SAD-u.



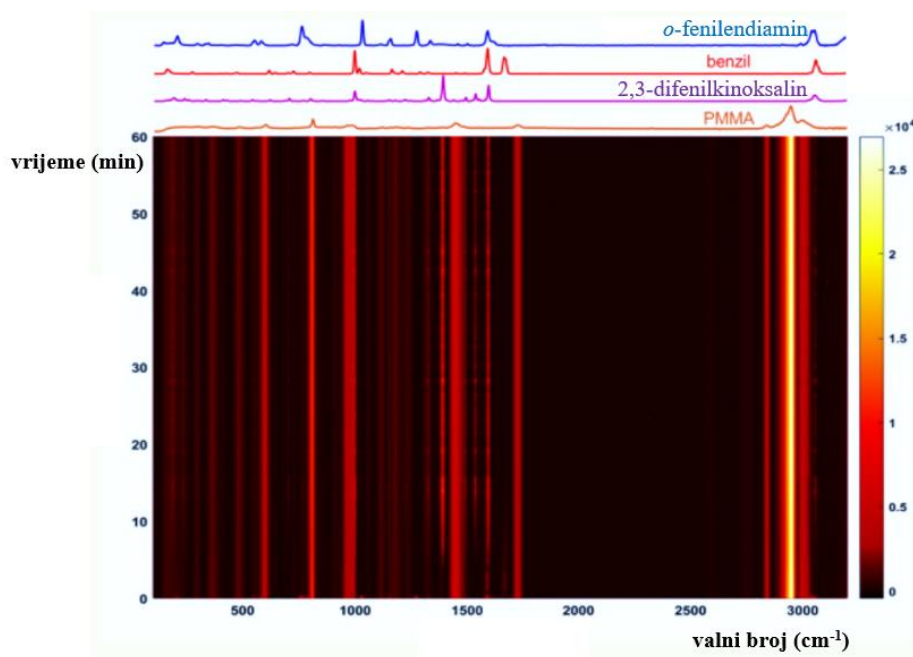
Slika 9. Ramanovi spektri silikata a) kvarca b) kristobalita.²⁶

Korištenjem *in situ* Ramanove spektroskopije za praćenje mehanokemijske sinteze derivata 2,3-difenilkinoksalina dokazala se po prvi puta izražena ovisnost kemijske reaktivnosti o malim varijacijama frekvencije mljevenja.²⁷ Budući da se Ramanovi signali reaktanata i kinoksalinskog proizvoda mogu lako razlikovati, a produkt se dobiva u visokom prinosu u manje od sat vremena, utvrđeno je kako je ovaj modelni sustav posebno privlačan za ispitivanje utjecaja frekvencije mljevenja na mehanokemijsku reaktivnost. Preliminarno ispitivanje modelne reakcije kondenzacije provedeno je mljevenjem *o*-fenilendiamina (108 mg, 1,0 mmol) s benzilom (210 mg, 1,0 mmol) pomoću mlina za miješanje Retsch MM400 na 30,0 Hz (Shema 4). Reakcijska smjesa stavljena je u optički prozirnu PMMA posudu od 15 ml, zajedno s jednom cirkonijevom kuglicom promjera 10,0 mm (oko 3,0 g). Istraženo je reakcijsko ponašanje pri mljevenju na 20,0 Hz, 22,5 Hz, 25,0 Hz, 27,5 Hz i 30,0 Hz.

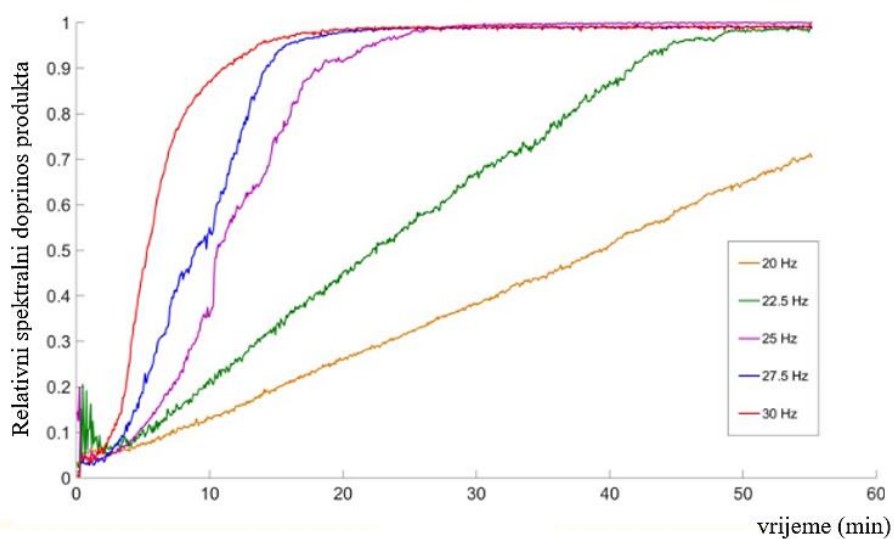


Shema 3. Sinteza 2,3-difenilkinoksalina iz benzila i *o*-fenilendiamina suhim mljevenjem.²⁷

Praćenjem reakcije *in situ* Ramanovom spektroskopijom te kasnijom analizom utvrđen je jasan nestanak signala reaktanata, kao i pojava jakih signala produkta (Slika 10). Potpuni nestanak signala reaktanata uočen je nakon mljevenja od približno 20 min. Tališta polaznih materijala kao i produkta znatno su iznad sobne temperature te nije opaženo taljenje pri mljevenju dva reaktanta stoga je stvaranje 2,3-difenilkinoksalina izvrstan primjer reakcije u čvrstom stanju. Također, analiza difraktograma praha sirove reakcijske smjese nakon mljevenja pokazala je da je produkt kristaliničan. U prosjeku trostrukih mjerenja vremenski ovisne varijacije spektralnog doprinosa produkta za svaku frekvenciju otkriva se izvanredna osjetljivost brzine reakcije na male promjene frekvencije mljevenja.



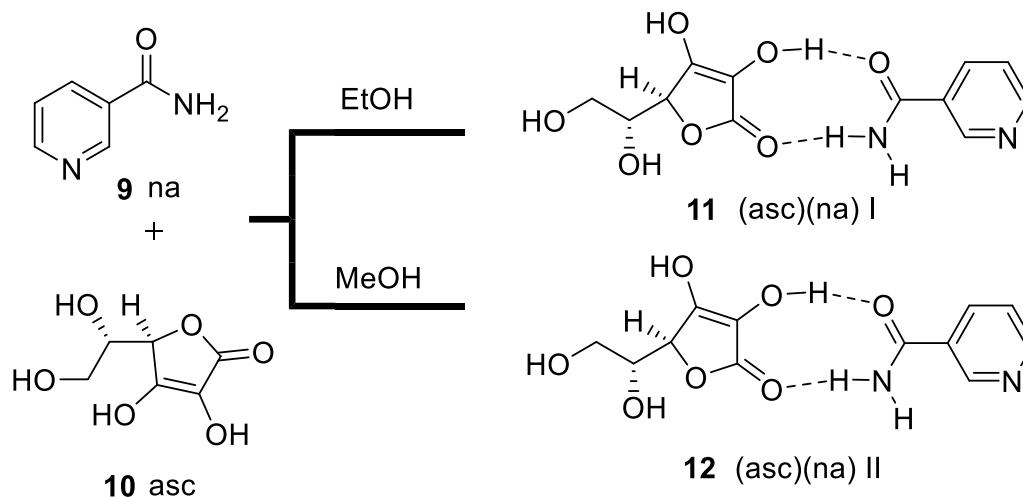
Slika 10. Vremenski razlučeni 2D Ramanov spektar.²⁷



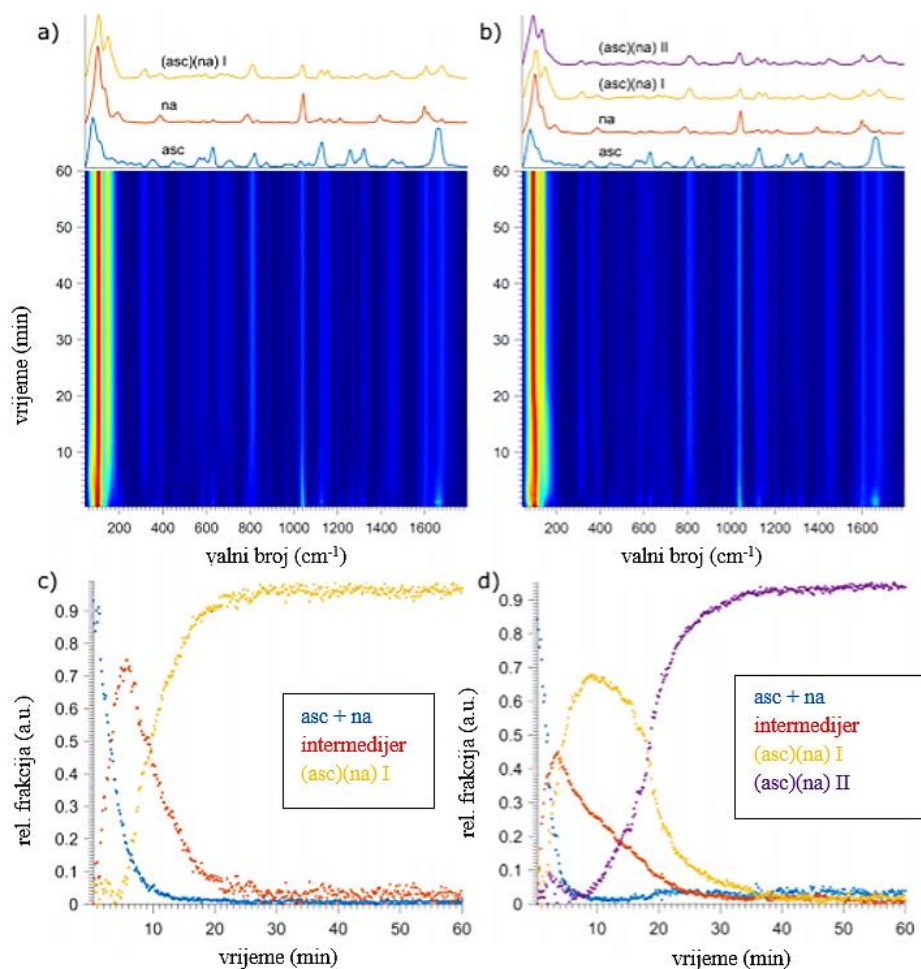
Slika 11. Utjecaj promjene frekvencije na kondenzaciju reaktanata tijekom mljevenja.²⁷

Na Slici 11, vidljivo je da napredak reakcije poprima sigmoidni profil na frekvencijama mljevenja većim od 25,0 Hz, što je u skladu s rezultatima ranijih *ex situ* studija reakcije Knoevenagelove kondenzacije. Također, uočava se linearno ponašanje svojstveno mljevenju pri frekvencijama ispod 25,0 Hz. Očekivano je da će na nižim frekvencijama (20,0 ili 22,5 Hz) opseg mehaničkog aktiviranja biti niži. Suprotno tome, pri višim frekvencijama brzina mehaničkog aktiviranja je mnogo veća i stvaranje produkta se odvija u jako aktiviranom okruženju, što dovodi do sigmoidne ovisnosti stvaranja produkta s vremenom.

Znanstvenici Laboratorija za zelenu sintezu na Institutu Ruđer Bošković proveli su mehanosintezu kokristala L-askorbinske kiseline (vitamin C) i nikotinamida (vitamin B3). S ciljem otkrivanja novog polimorfa II, termodinamički stabilnijeg u usporedbi s već ranije poznatim polimorfom I, primijenjena je *in situ* Ramanova spektroskopija te tekućinom potpomognuto mljevenje.²⁸ Vođeni idejom kako promjena volumena tekućine utječe na ishod reakcije, uspjeli su pripremiti polimorf II povećanjem količine metanola do 40 μ L. Polimorf I, nastaje u prvih 10 min mljevenja te se potom transformira u polimorf II kako je primijećeno u LAG-u s 20 μ L MeOH. Na Slikama 11b i 11d vidljivo je kako je spomenuta transformacija dovršena nakon 40 min mljevenja. Formiranje ranije poznatog polimorfa I započinje nakon 5 min, a konačan produkt nastaje nakon 25 min mljevenja (Slika 12a, 12c).



Shema 4. Prikaz molekularnih struktura nikotinamida (na) i L-askorbinske kiseline (asc) te reakcijskih uvjeta za dobivanje polimorfa.

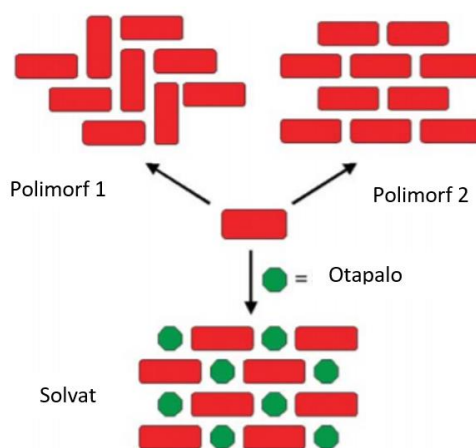


Slika 12. Vremenski razlučeni Ramanovi spektri dobiveni tijekom mljevenja vitamina C i nikotinamida te odgovarajući reakcijski profili uz dodatak: a), c) etanola b), d) metanola.

2.3. Polimorfija

Uspjesi mehanosinteze potpomognute tekućim aditivima potaknuli su proučavanje i sintezu tehnološki važnih farmaceutskih polimorfa. Polimorfija je posebno istraživana u farmaceutskoj industriji, kristalnom inženjerstvu te proizvodnji novih materijala.²⁹ U kristalnoj bazi podataka, 16 014 spojeva nosi oznaku polimorfa, a 2009. godine bilo je novih 184 takvih unosa.

Polimorfizam (grč. *polys* - višestruko, *morfe* - oblik) se odnosi na pojavu čvrste tvari u više kristalnih formi. Polimorfi se osim po kristalnoj strukturi, razlikuju po fizikalnim i kemijskim svojstvima dok njihov kemijski sastav ostaje isti. Pri povišenom tlaku stabilnije su modifikacije s gušće složenim atomima, a pri povišenoj temperaturi one s manjom gustoćom. Promjenom uvjeta očekuje se interkonverzija odnosno prijelaz iz manje stabilne u drugu, stabilniju modifikaciju (Slika 13).³⁰

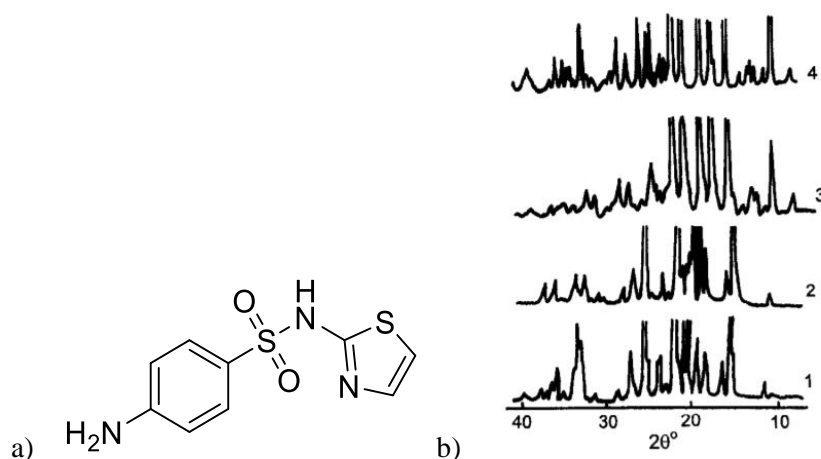


Slika 13. Gradivni blokovi polimorfa.³¹

Strukturne transformacije mogu se odvijati na različite načine: putem promjene koordinacijskog broja odnosno rasporeda prvih susjednih atoma, promjene rasporeda udaljenijih atoma, prijelaza vezanih uz uređenost strukture te promjena tipa veze. Ovisno o veličini promjene razlikuju se brzi i reverzibilni prijelazi koji uključuju manje pomake atoma te rekonstrukcijski prijelazi za koje je potrebna visoka energija, a takva se transformacija sporo odvija. Primjer transformacije do koje dolazi pri temperaturi od 445 °C i promjenom koordinacijskog broja je prijelaz: $^{\text{VIII}}\text{CsCl} \xrightarrow{445\text{ }^{\circ}\text{C}} ^{\text{VI}}\text{CsCl}$.²³ Pritom se interkonverzijom heksaedarska struktura mijenja u romboedarsku strukturu.

Polimorfija može predstavljati problem ukoliko određena forma lijeka dovodi do manje stabilnih i slabije topljivih svojstava što može uzrokovati negativne posljedice na pacijenta. Većina lijekova (80-90%) formulirana je u obliku tableta s ciljem ostvarivanja pouzdane isporuke, a sam postupak tabletiranja zahtjeva primjenu značajnih pritisaka što može dovesti do površinske reakcije između komponenata te u konačnici do polimorfnih promjena i pojave nestabilnosti. S druge strane, u većini slučajeva pojava metastabilnih polimorfnih oblika ljekovite tvari pokazuje veću terapijsku aktivnost u usporedbi sa stabilnim formama. Primjerice, metastabilni polimorf paracetamola se u usporedbi s termodinamički stabilnijim polimorfom lakše tableтира zbog svoje slojevite strukture. Upravo se uvođenjem ljekovitih tvari u nosače lijekova omogućilo stabiliziranje metastabilnih stanja, a mehaničko aktiviranje je jedna od metoda za pripravu takvih sustava.

U Rusiji, na Institutu kemije čvrstog stanja proučavan je utjecaj primjene mehaničke sile na polimorfiju sulfatiazola i piroksikama.³² Instrumentalnim tehnikama poput rendgenske difrakcije i IR spektroskopije potvrđeno je da mehanička obrada dovodi do djelomične amorfizacije aktivne komponente i polimorfne transformacije sulfatiazola, aktivnog farmaceutskog sastojka iz skupine sulfonamida koji posjeduje antibakterijska svojstva. Polimorfija sulfatiazola tema je istraživanja još od 1939. godine. Naime, u literaturi postoje opisana njegova tri polimorfa. Primjenom mehaničke energije, polimorf III prevodi se u polimorf I što se potvrdilo obradom dobivenog difraktograma (Slika 14). Upravo je polimorf I najprikladniji oblik sulfatiazola za farmaceutsku upotrebu zbog njegove najbolje topljivosti.

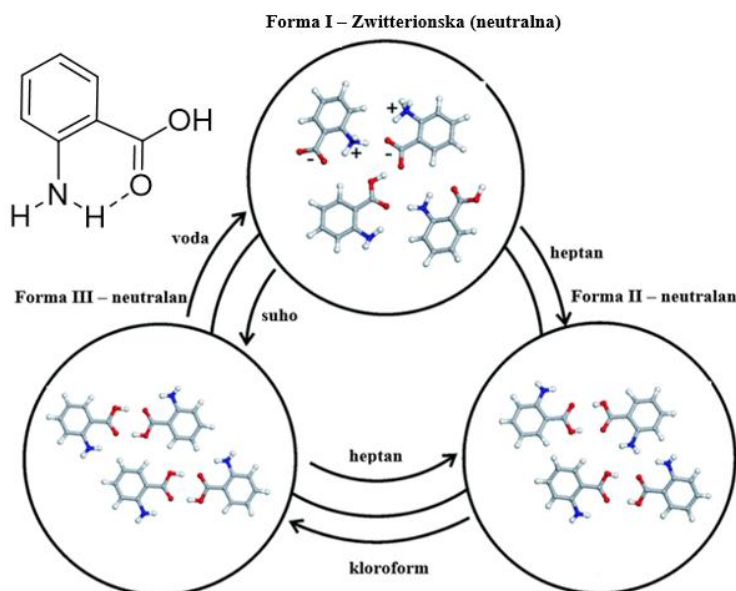


Slika 14. a) molekulska struktura sulfatiazola

b) rendgenskih difraktograma: 1) sulfatiazol-početni, 2) nakon 1 min mljevenja, 3) nakon 40 min mljevenja, 4) sulfatiazol-polimorf I.³²

Osim toga, poznato je da se brzina otapanja sulfatazola povećava ukoliko se nalazi u smjesi s polivinilpirolidonom (PVP). Prilikom mljevenja, formiraju se vodikove veze između amino skupine sulfatazola i karbonilne skupine PVP-a. Dokazano je kako mehanička aktivacija lijekova u smjesama s polivinilpirolidonom omogućava dobivanje stabilnih uzoraka s povećanom brzinom otapanja.

Prethodno je rečeno kako LAG metoda omogućuje selektivno dobivanje polimorfa. Jones i suradnici uspjeli su postići interkonverziju triju poznatih polimorfa *o*-aminobenzojeve kiseline (antranilne kiseline) pri različitim reakcijskim uvjetima. U slučaju sukcininske kiseline, β -polimorf je neutralan pri suhom mljevenju, a dodatak nepolarnih tekućina doveo je do nastanka α -polimorfa. Uočeno je kako dodatak polarnih tekućina poput acetonitrila i metanola ne izaziva polimorfne transformacije (Slika 15).¹³



Slika 15. Prikaz interkonverzije triju poznatih polimorfa *o*-aminobenzojeve kiseline.

Dodatno, primjeri polimorfije u industriji su dimorfizam 2,4,6-trinitrotoluena (TNT) i ljubičasti pigment kinakidron koji postoji u četiri kristalna oblika.²⁸ Širom svijeta godišnje se proizvedu tone kinakidronskih pigmenata. Svaki polimorf pigmenta kinakidrona razlikuje se u boji, a polimorfni prijelazi odvijaju se pri povišenim temperaturama uz adekvatno otapalo. S druge strane, postoje veliki rizici povezani s polimorfizmom dobro poznatog eksploziva TNT koji je poznat u dvije polimorfne modifikacije, a interkonverzija uzrokuje nestabilnost, povećava detonaciju i osjetljivost.

2.3.1. Polimorfi 4-nitrobenzojeve kiseline

Kristalizacija iz otopine temeljni je izolacijski proces sveprisutan u farmaceutskoj industriji gdje je cilj laboratorijskih i industrijskih metoda dobiti kristale odgovarajuće veličine i morfologije. U farmaceutskoj industriji potrebno je osigurati adekvatnu topljivost i raspodjelu veličine čestica aktivne farmaceutske komponente. Proučavanje polimorfnih modifikacija od velikog je interesa budući da različiti polimorfni oblici ostvaruju drugačiji utjecaj na svojstva i aktivnost djelatne tvari.

Derivati jednostavne benzojeve kiseline poput 4-nitrobenzojeve kiseline poznati su gradivni blokovi široko primjenjivani u kristalnom inženjerstvu. U kristalografskoj bazi podataka (eng. *Cambridge Structural Database*, CSD) prisutna su tri različita polimorfa za 4-nitrobenzojevu kiselinu koja kristalizira u različitim prostornim grupama. Polimorf I kristalizira u $C2/c$ prostornoj grupi, polimorf II u $P2_1/n$ te polimorf III u $P2_1/c$. Parametri jedinične ćelije za polimorf I su $\alpha = 20,9 \text{ \AA}$, $\beta = 5,0 \text{ \AA}$, $\gamma = 12,8 \text{ \AA}$, $\beta = 97,1^\circ$, polimorf II $\alpha = 5,4 \text{ \AA}$, $\beta = 5,1 \text{ \AA}$, $\gamma = 24,7 \text{ \AA}$, $\beta = 96,9$ i polimorf III $\alpha = 6,4 \text{ \AA}$, $\beta = 7,6 \text{ \AA}$, $\gamma = 14,1 \text{ \AA}$, $\beta = 90,8^\circ$.^{33,34} Za proučavanje molekulskih struktura, molekularnih interakcija i stabilnosti polimorfa koriste se rendgenska difrakcija, infracrvena spektroskopija, termogravimetrijska analiza te se za predikciju stabilnosti polimorfa koristi računalna kemija. Polimorf III predviđen je računalnom kemijom te je eksperimentalno sintetiziran nakon 40 godina proučavanja. Kristalizacija 4-nitrobenzojeve kiseline iz acetona, etanola, metanola, acetonitrila i propanola rezultira polimorfom I, dok se polimorf II priređuje kristalizacijom iz dioksana. Polimorf III pripremljen je kristalizacijom iz otopinske smjese anilina i dioksana. Provedena je kristalizacija uz varijaciju količine otapala anilina i dioksana gdje je pri niskim koncentracijama anilina primjećen nastanak polimorfa II. Analizom emisije zračenja odnosno fluorescencijskom spektroskopijom praćen je utjecaj anilina kao promotora za nastanak polimorfa III. Porastom koncentracije 4-nitrobenzojeve kiseline u dioksanu dolazi do smanjenja intenziteta emisije, a uz dodatak anilina kvantni prinos fluorescencije dodatno je smanjen. Na temelju navedenog zaključuje se da je anilin učinkovit gasitelj fluorescencije, jer uzrokuje agregaciju molekula putem π - π interakcija.³⁴

Relativna stabilnost polimorfa određena je pomoću diferencijalne pretražne kalorimetrije pri čemu je talište polimorfa I pri $241,0 \text{ }^\circ\text{C}$, polimorfa II pri $240,2 \text{ }^\circ\text{C}$ te polimorfa III pri $225,3 \text{ }^\circ\text{C}$. Polimorf III nestabilan je pri sobnoj temperaturi te prelazi u amorfni oblik kroz 1 do 2 dana.³⁴

2.4. Kinetički-izotopni efekt

Glavni ciljevi suvremene farmaceutike su unaprijeđenje postojećih i razvijanje novih oblika lijekova koji omogućuju učinkovitije liječenje bolesti uz smanjenje nuspojava. Deuteriranjem se poboljšavaju farmakokinetička svojstva postojećih lijekova stoga se spojevi s deuterijem primjenjuju u raznim područjima znanosti poput kemije materijala, proteomike, dijagnostike, farmakologije te istraživanja i razvoja lijekova.

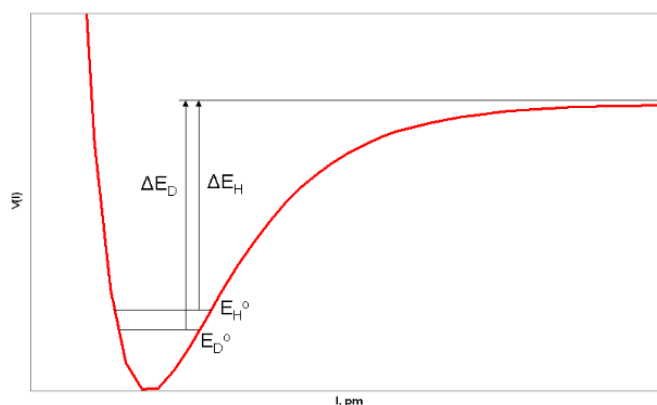
Prirodni izotopi vodika međusobno se razlikuju u fizikalno-kemijskim svojstvima, a njihovom zamjenom postiže se bolja djelotvornost i metabolička stabilnost potencijalnog lijeka. Najzastupljeniji vodikov izotop je procij (^1H) čiji maseni udio iznosi 99,98%. Drugi najzastupljeniji stabilan izotop vodika je deuterij (^2H ili D) čiji udio u prirodnom uzorku vodika iznosi 0,0156%.^{35,36} Jezgra deuterija sadrži jedan proton i jedan neutron za razliku od jezgre procija koja sadrži samo jedan proton te je C-D veza čvršća i kraća za 0,005 Å što utječe na smanjenje frekvencija vibracijskih istezanja i do niže energije osnovnog vibracijskog stanja.³⁷ Upravo radi stabilnijeg stanja, potrebna je veća energija za kidanje C-D veze u odnosu na C-H vezu, a posljedično je brzina reakcije gdje se cijepa C-D veza manja ($k_{\text{H}} > k_{\text{D}}$). Razlike u stabilnosti spojeva supstituiranih različitim izotopima i posljedično različite brzine reakcija opisuju se kinetičkim izotopnim efektom (KIE) odnosno deuterijskim kinetičkim izotopnim efektom (DKIE), ako se rabi deuterij kao izotopna zamjena. DKIE se opisuje omjerom konstanti brzina reakcija s reaktantom koji sadrži procij (k_{H}) i reaktantom koji sadrži deuterij (k_{D}). Općenito, KIE se prikazuje omjerom konstanta brzine reakcija koje uključuju reaktant koji sadrži lakši (k_{l}) i teži izotop (k_{h}).³⁸

$$KIE = \frac{k_{\text{l}}}{k_{\text{h}}} \quad (1)$$

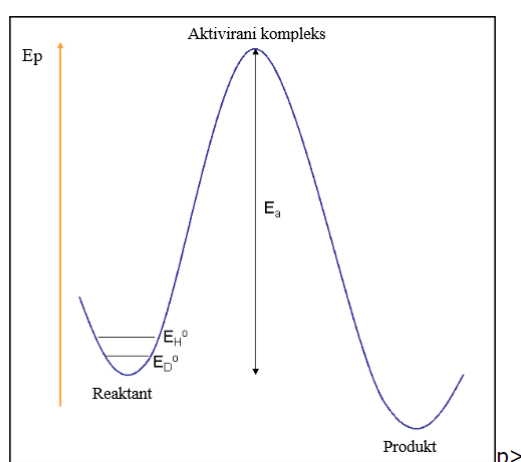
Izotopna supstitucija najčešće se odnosi na zamjenu procija deuterijem, jer se zbog velike razlike u masi izotopa i posljedično time prisutne razlike u frekvencijama vibriranja veza, opaža značajan kinetički-izotopni efekt. Također moguće su i zamjene ugljikovih, dušikovih i kisikovih izotopa. Kada se jedan izotop zamijeni drugim, dolazi do promjena vibracijskih frekvencija istezanja veze što se opisuje jednadžbom istezanja opruge pri čemu je frekvencija, ν , proporcionalna korijenu konstante sile, k , a obrnuto proporcionalna korijenu reducirane mase atoma, mr , koji sudjeluju u stvaranju veze:

$$\nu = \frac{1}{2\pi} \sqrt{\frac{k}{mr}} \quad (2) \text{ i } mr = \frac{m_1 m_2}{m_1 + m_2} \quad (3).$$

Po statističkoj termodinamici, razlika u brzini reakcija s lakšim i težim izotopom može se promatrati kao posljedica razlike u promjenama energija nulte točke (ZPE, eng. *zero-point energy*) reaktanata i prijelaznog stanja prilikom izmjene izotopa. KIE je maksimalan za reakciju disocijacije veze budući da te reakcije nemaju prijelazno stanje zbog čega KIE ovisi samo o promjeni ZPE reaktanata prilikom izmjene izotopa. Na Slici 16 prikazana je ovisnost potencijalne energije o međuatomskoj udaljenosti. E_D^0 i E_H^0 odgovaraju energijama nulte točke deuterija i procija odnosno ukazuju na najnižu moguću energiju sustava, tj. na energiju osnovnog stanja.³⁹ Energija osnovnog stanja ovisi o reduciranoj masi molekule. Što je molekula teža, niža je vibracijska frekvencija te je niža energija nulte točke. Navedeno rezultira različitim energijama disocijacije veze za R-D i R-H pri čemu je energija disocijacije R-D veze (ED) veća od energije disocijacije R-H veze (EH) (Slika 17).³⁵

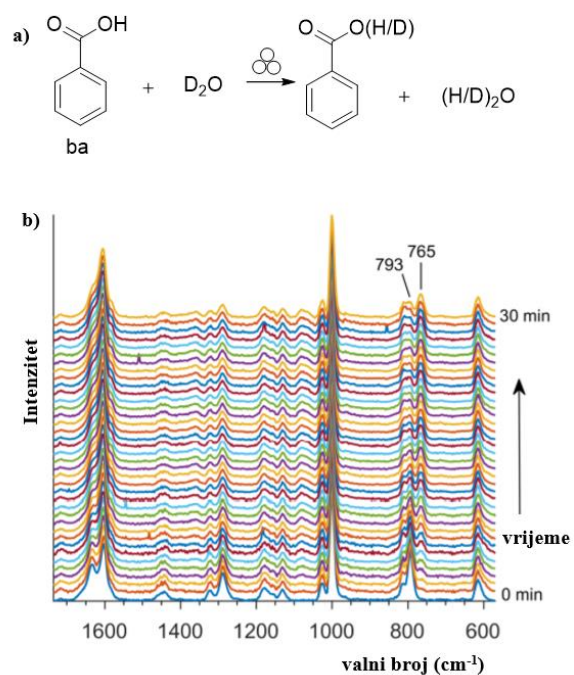


Slika 16. Grafički prikaz ovisnosti potencijalne energije o međuatomskoj udaljenosti.³⁹



Slika 17. Razlike u energiji aktivacije za disocijaciju R-D odnosno R-H veze.³⁵

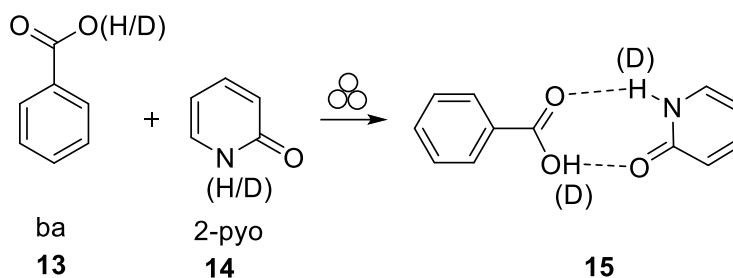
Prilikom sinteze spojeva koji sadrže deuterij koristi se pristup izotopne izmjene, pri čemu se deuterij uvodi u željenu molekulu, kao i pristup konvencionalne višestupanjske sinteze (eng. *deuterated pool synthesis*, DP) gdje se koriste deuterirani reagensi. U slučaju izotopne izmjene, deuterij se uvodi upotrebom teške vode, D_2O ili plina D_2 reduktivnim deuteriranjem, fotokatalitičkim deuteriranjem, izmjenom halogen/deuterij uz aromatsko dehalogeniranje ili izmjenom vodik/deuterij. Posljednje navedeni način izmjene je najkorišteniji, a može se izvoditi upotrebom teških metala koji djeluju kao katalizatori (npr. Pd, Pt) ili uz uporabu kiselo-baznih katalizatora. Primjerice, izotopna H/D izmjena može se provesti mehanokemijskom LAG metodom koristeći benzojevu kiselinu (ba) i D_2O u omjeru 1:1. Deuteracija benzojeve kiseline prati se *in situ* tehnikom gdje se kao rezultat u Ramanovim spektrima javlja porast intenziteta vrpce na 765 cm^{-1} prilikom prijelaza deuterija s D_2O na ba. Osim toga, uočava se pad intenziteta vrpce na 793 cm^{-1} koja odgovara nedeuteriranoj benzojevoj kiselinu (Slika 18).⁴⁰



Slika 18. a) shema izotopne H/D izmjene LAG metodom b) Ramanovi spektri kao rezultat mljevenja ba s D_2O .⁴⁰

Također, izotopna izmjena vodika i deuterija proučavana je prilikom mljevenja benzojeve kiseline (ba) i 2-piridona (pyo).⁴⁰ Mljevenjem reaktanata u odgovarajućoj posudi dolazi do molekularnih odnosno atomskih migracija ostvarivanjem površinskog kontakta, a *in situ* praćenjem moguće je uočiti izmjenu atoma. Izvedeni su pokusi u kojima oba reaktanta nisu deuterirana, u kojima je jedan od reaktanata deuteriran te gdje su oba deuterirana. Izmjereni

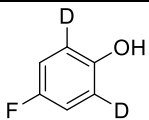
Ramanovi spektri pokazuju izotopnu raspodjelu nakon 25 min mljevenja. U spektrima je prisutna vibracijska vrpca karboksilatne skupine za ba na 793 cm^{-1} odnosno za ba-d na 765 cm^{-1} . Za kokristal ba:pyo koji nastaje mljevenjem nedeuteriranih reaktanata vibracijska vrpca benzojeve kisline pojavljuje se na 800 cm^{-1} , a za kokristal građen od deuteriranih reaktanata na 774 cm^{-1} . Prilikom mljevenja ba-d i pyo, vrpca na 765 cm^{-1} se smanjuje, dok se vrpca na 774 cm^{-1} povećava kako se ba-d ugrađuje u kokristal.



Shema 5. Mehanokemijsko formiranje kokristala ba:pyo.⁴⁰

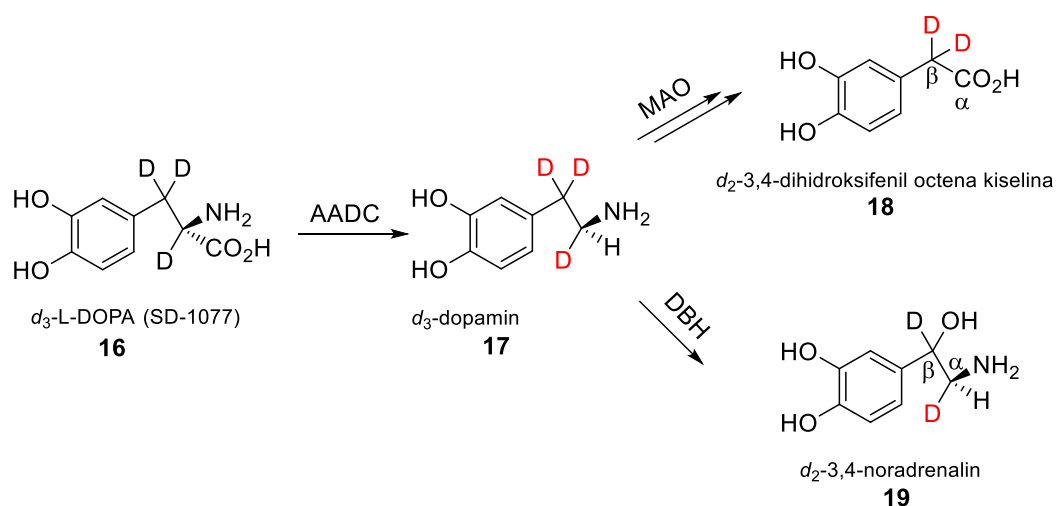
Tijekom razvoja novih ili poboljšanja postojećih lijekova kao efikasna strategija pokazala se inkorporacija deuterija u strukturu bioaktivnih spojeva. Razlike u fizikalno-kemijskim svojstvima između izotopa procija i deuterija su male, ali mjerljive te ukazuju na manju lipofilnost ($\Delta \log P = -0,006$) i manji molarni volumen deuterija (za $0,140\text{ cm}^3/\text{mol}$ po atomu) kao i na niže pKa vrijednosti spojeva s deuterijem. Lipofilnost je fizikalno-kemijski deskriptor ksenobiotika koji na zadovoljavajući način opisuje njihove biološke osobine. Uvođenjem deuterija u spojeve koji sadrže amino skupinu, povećava se njihova bazičnost ovisno o stereokemijskom položaju deuterija, a kiselost fenola i karboksilnih kiselina smanjuje se i do $0,031\text{ pK}$ jedinica po atomu deuterija (Tablica 2).⁴¹

Tablica 2. Utjecaj deuteriranja na bazičnost amina i kiselost karboksilnih kiselina.

Amini/ kiseline	$\Delta\text{ pKa}$ u odnosu na nedeuterirane analoge
CD_2NH_2	$+0,017 \pm 0,003$
CD_2HNH_2	$+0,034 \pm 0,002$
DCO_2H	$-0,031 \pm 0,0005$
	$-0,011 \pm 0,0005$

Supstitucija deuterijem u razvoju lijekova bazira se na pretpostavci da je C-D veza čvršća što utječe na sporiju enzimsku katalizu, usporavanje metaboliziranja i prolongiranje djelovanja.

Reakcije oksidacije jedne su od najvažnijih reakcija pri transformaciji ksenobiotika, a kataliziraju ih monooksigenaze poput citokroma p-450 (CYP). Hidroksilirane ili na neki drugi način promijenjene supstancije prevode se pomoću enzima u polarne metabolite čime se povećava njihova topljivost u vodi te olakšava izlučivanje iz organizma. Deuteriranje lipofilnih lijekova povoljno utječe na kinetiku ovakvih reakcija, ali efekt deuteriranja nije uvijek predvidljiv, jer njegova inkorporacija može uspješno reducirati metabolizam na određenom položaju, a enzimsku aktivnost može usmjeriti na neki drugi dio molekule. Na primjer, levodopa je najučinkovitija lijekovita tvar u liječenju simptoma Parkinsonove bolesti, a mehanizam djelovanja temelji se na inhibiciji razgradnje dopamina u mozgu blokiranjem aktivnosti enzima monoamin oksidaza (MAO). To je aminokiselina koja prelazi u dopamin djelovanjem enzima dopa dekarboksilaze, prelazi krvno-moždanu barijeru i u mozgu se dekarboksilira.⁴² Razvoj SD-1077 (*d*₃-L-DOPA, deulevodopa) ukazuje kako reakcije katalizirane monoamino oksidazama i dopamin β -hidroksilazom (DBH) mogu biti afektirane izotopnom supstitucijom. Naime, nakon dekarboksilacije SD-1077 uz dekarboksilazu aromatskih L-aminokiselina (AADC, eng. *aromatic L-amino acid decarboxylase*), metabolizam *d*₃-dopamina regulira se deuteracijom. Uvođenjem deuterija na α -ugljikov atom usporava se aktivnost enzima oksidaze kao i *d*₂-3,4-dihidroksifenil octene kiseline. S druge strane, deuterij vezan na β -ugljikov atom smanjuje funkciju hidroksilaze i nastanak *d*₂-noradrenalina.



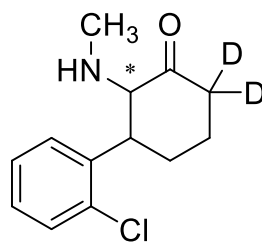
Shema 6. Utjecaj deuterija na metabolizam levodope.³⁷

Također, deuteriranje može poboljšati svojstva polaznih radionuklida, nestabilnih i radioaktivnih jezgri atoma koji se koriste kao biomarkeri. Nedeuterirani analog radio-označenog MAO-b inhibitora koristi se kao biomarker za kvantifikaciju enzimске aktivnosti u

mozgu. Međutim, karakterizira ga prebrzo i ireverzibilno vezanje na enzim čime je njegova distribucija u tkiva određena protokom krvi, a ne razinom oksidaza. Supstitucija vodika deuterijem usporava navedenu reakciju čime se povećava osjetljivost metoda za praćenje enzimске aktivnosti.³⁵

Osim toga, deuteriranje talidomida primjer je povoljnog utjecaja deuterija na smanjenje toksičnog učinka nedeuteriranog analoga. Talidomid je sedativ kojeg su koristile trudnice protiv nesаницe i povraćanja sve do zabilježavanja porasta broja djece s deformacijama udova.⁴² Po kemijskoj strukturi, talidomid je α -N-ftalidoglutarimid odnosno derivat glutaminske kiseline koji se sastoji od ftalimidinskog i glutarimidinskog prstena. Talidomid ima dva para enantiomera, *R* i *S* pri čemu *R*-izomer djeluje kao sedativ, a *S*-izomer je teratogen. Naime, u organizmu pod fiziološkim uvjetima dolazi do brze racemizacije talidomida stoga je neizbježan teratogeni učinak *S*-enantiomera. Sintetizirani su mnogi analozi talidomida u svrhu smanjenja teratogenog djelovanja, a deuteriranje kiralnog centra kod oba oblika enantiomera pokazalo se efikasnim za povećanje stabilnosti *R*-*d*₁-talidomida pet puta u odnosu na nedeuterirani *R* talidomid.³⁷

Deuteriranjem se omogućuje i bolje razumijevanje mehanizma djelovanja pojedinih lijekova tako da se ispituje utjecaj određenog metabolita u ukupnom biološkom sistemu. Primjerice, deuteracijom je ispitan depresivni učinak ketamina, anestetika koji inhibira glutamatne N-metil-D-aspartatne (NMDA) receptore, ključne za proces neurotransmisije u centralnom živčanom sustavu (Slika 19). Naime, uočeno je kako sub-halucinogena doza nedeuteriranog ketamina posjeduje antidepresivni učinak koji može trajati 1-2 tjedna. Kako bi se proučio mehanizam djelovanja, u mozgu štakora praćene su razine ketamina i njegovih metabolita pri čemu se uspostavilo da je presudan metabolit pronađen u većim koncentracijama u plazmi i mozgu te da on utječe na antidepresivni efekt. Potom je provedena deuteracija ketamina što je dovelo do slabijeg metaboliziranja čime je potvrđeno antidepresivno djelovanje (2*S*,6*S*;2*R*,6*R*)-hidroksinorketamina.

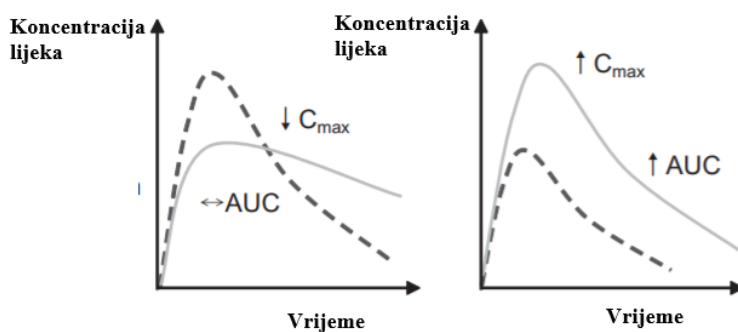


d_2 -ketamin

20

Slika 19. Kemijska struktura deuteriranog analoga ketamina.

Najvažniji učinak deuteracije je smanjenje brzine eliminiranja lijeka odnosno povećanje poluživota djelatne tvari (Slika 20, lijevo) kao i povećanje biorasploživosti (Slika 20, desno). Time se smanjuje učestalost nuspojava i povećava djelotvornost lijeka, a potrebna doza se reducira. Naime, deuteriranjem se usporavaju metabolički procesi čime se povećava biorasploživost kao i maksimalna koncentracija aktivne tvari u krvi. Na Slici 20, AUC (eng. *area under curve*) je područje ispod krivulje koje predstavlja izloženost lijeka u ovisnosti o vremenu, a C_{max} je maksimalna koncentracija lijeka u plazmi nakon primjene. AUC je najpouzdaniji pokazatelj biološke valjanosti te je razmjernan ukupnoj količini nepromijenjenog lijeka koja stigne u sistemsku cirkulaciju. Vidljivo je da smanjeno metaboliziranje rezultira većom koncentracijom lijeka raspoloživog za ostvarivanje biološkog učinka.



Slika 20. Utjecaj deuteriranja na farmakokinetiku,

-: nedeuterirani lijek,

---: deuterirani lijek.³⁹

2.5. Računalno modeliranje

Razvojem računalnih softvera omogućeno je proučavanje kemijskih fenomena bez eksperimentalnog istraživanja tijekom kemijskih reakcija kao i modeliranje te karakterizacija energetskih profila različitih kristalnih oblika čije se strukture ne mogu eksperimentalno opaziti.⁴³ Računalna kemija koristi simulacije utemeljene na kvantnoj kemiji obuhvaćajući *ab initio* pristupe ugrađene u učinkovite programe s ciljem rješavanja složenih kemijskih problema te proučavanja struktura i svojstava molekula.⁴⁴ Metode koje se u izračunima isključivo oslanjaju na zakone kvantne mehanike dugotrajne su radi korištenja velikog broja parametara zbog čega se često pribjegava računalno manje zahtjevnim i jednako pouzdanim metodama kao što je teorija funkcionala (elektronske) gustoće (eng. *density functional theory*, DFT).⁴⁵

2.5.1. Teorija funkcionala gustoće

Računske metode koje se baziraju na teoriji funkcionala gustoće predstavljaju osnovne metode za račun u čvrstom stanju.⁴⁶ Teorija funkcionala gustoće za glavnu komponentu uzima gustoću elektrona $n(\vec{r})$ koja ovisi o samo tri prostorne varijable čime se dimenzionalnost problema reducira što je ujedno i glavna prednost navedene metode. Osnovu teorije čine dva teorema Hohenberga i Kohna koja se temelje na promatranju skupa određenog broja elektrona koji se gibaju pod utjecajem vanjskog potencijala jezgri te međusobnog Coulombovog odbijanja pri čemu je elektronska gustoća funkcional vanjskog potencijala.

Hohenberg – Kohnovi teoremi ne omogućavaju izračun gustoće elektrona u osnovnom stanju nego se primjena DFT teorije zasniva na Kohn – Shamovim iterativnim jednadžbama. Ideja je pronaći jednoelektronske funkcije (Kohn-Shamove orbitale) kojima će se producirati prava elektronska gustoća. Uvodi se pojednostavljenje problema na način da se početni sustav međudjelujućih elektrona promatra kao fiktivni, pomoćni sustav nemeđudjelujućih elektrona za koji se ukupna energija može zapisati u obliku:

$$E[n(\vec{r})] = \int n(\vec{r}) v_{\text{ext}}(\vec{r}) d\vec{r} + Ts(\vec{r}),$$

gdje je $Ts(\vec{r})$ kinetička energija elektrona u osnovnom stanju koji nisu u međusobnoj interakciji. Svaka nemeđudjelujuća čestica giba se u nelokalnom Kohn – Shamovom potencijalu, V_{KS} , koji se prikazuje kao zbroj vanjskog potencijala te potencijala izmjene i korelacije koji je nepoznanica DFT teorije. Nepoznati član energije izmjene i korelacije

$E_{XC}[n(\vec{r})]$ sadrži razliku kinetičke energije međudjelujućih i nemeđudjelujućih elektrona kao i doprinose energiji odbijanja elektrona. U potrazi za što preciznijim funkcionalom gustoće koristi se aproksimacija poopćenog gradijenta (eng. *generalised gradient approximation*, GGA) koja uz lokalnu vrijednost gustoće elektrona ovisi i o lokalnom gradijentu gustoće elektrona. Kohn – Shamove jednačbe rješavaju se iterativno gdje iteracija započinje aproksimacijom gustoće elektrona u osnovnom stanju, zatim se određuje efektivni potencijal u kojem se gibaju elektroni čime se kao rezultat rješavanja jednačbe dobivaju funkcije elektrona $\Theta(\vec{r})$. Gustoća elektrona u osnovnom stanju dobiva se sumiranjem prethodno izračunatih kvadrata funkcija gdje gustoća elektrona treba biti jednaka početnoj.⁴⁵

2.5.2. Ravni valovi i pseudopotencijali

Polazište kvantno-mehaničkih izračuna je Schrödingerova jednačba koja se egzaktno može riješiti samo za jednoelektronske sustave. Višeelektronski problemi mogu se riješiti provođenjem izračuna na periodičnim sustavima i primjenjujući Blochov teorem. Blochov teorem govori da se u periodičnom kristalu svaka elektronska valna funkcija može zapisati kao umnožak ravnog vala i periodične funkcije koja se razvija korištenjem baze ravnih valova čiji su valni vektori, vektori recipročne rešetke kristala. Recipročna rešetka je imaginarna rešetka čija se primitivna ćelija naziva prvom Brillouinovom zonom, a konstruira se na temelju direktne kristalne rešetke u realnom prostoru. Prema definiciji recipročne rešetke, gustoća \vec{k} -točaka proporcionalna je volumenu kristala. Provođenje računa za beskonačne kristale s beskonačno mnogo elektrona i k -točaka nije praktično zbog čega su razvijene metode kojima se računaju elektronska stanja u diskretnim skupovima k -točaka unutar Brillouinove zone.⁴⁷ Naime, u račune se uzimaju samo oni ravni valovi čija je kinetička energija manja od odabrane maksimalne E_{cutoff} , a konačan je cilj zadovoljavajuća konvergencija rezultata.⁴⁸

Blochov teorem i razvoj velike baze ravnih valova neprikladan je zbog čega su potrebna dodatna pojednostavljenja kojima će se smanjiti vrijeme računanja i reducirati bazni skupovi ravnih valova. Uvodi se aproksimacija kojom se potencijal koji stvara jezgra i unutarnji elektroni zamjenjuje efektivnim potencijalom, pseudopotencijalom, budući da svojstva materijala ovise o gibanju valentnih elektrona. Pseudopotencijali razlikuju se po vrsti aproksimacije koja se koristi te su najčešće zapisani u tekstualne datoteke pomoću kojih se ovisno o materijalu i problemu odabire odgovarajući.^{49,50}

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. Opće napomene

Mehanokemijske reakcije provedene su u laboratorijskom kugličnom mlinu IST500 pri frekvenciji od 30,0 Hz koristeći prozirne PMMA posude volumena 14 mL za mljevenje s dvije čelične kuglice promjera 7,0 mm te mase 1,3 g. Reakcijske smjese mljevene su 45 min.

Za svaki eksperiment dodano je 250,68 mg (1,5 mmol) 4-nitrobenzojeve kiseline (4-nba). U jedan kraj posude izvagana je 4-nba, a u drugi kraj posude uz kuglice je dodano 0,9 mmol odgovarajućeg otapala. Oba kraja posuda pažljivo su spojena kako ne bi došlo do miješanja krutine i tekućine prije pokretanja mljevenja. Za mehanosintezu korištena su sljedeća otapala: MeOH, EtOH, MeCN, H₂O, D₂O, EtOAc, DMF te heptan. S ciljem ispitivanja utjecaja množine dodanih otapala na kinetiku polimorfnih transformacija provedeni su eksperimenti s jednakim volumenima, ali različitim množinama sljedećih tekućina: MeOH (0,4 mmol) i H₂O (0,9 mmol) te MeOH (1,3 mmol) i EtOH (0,9 mmol).

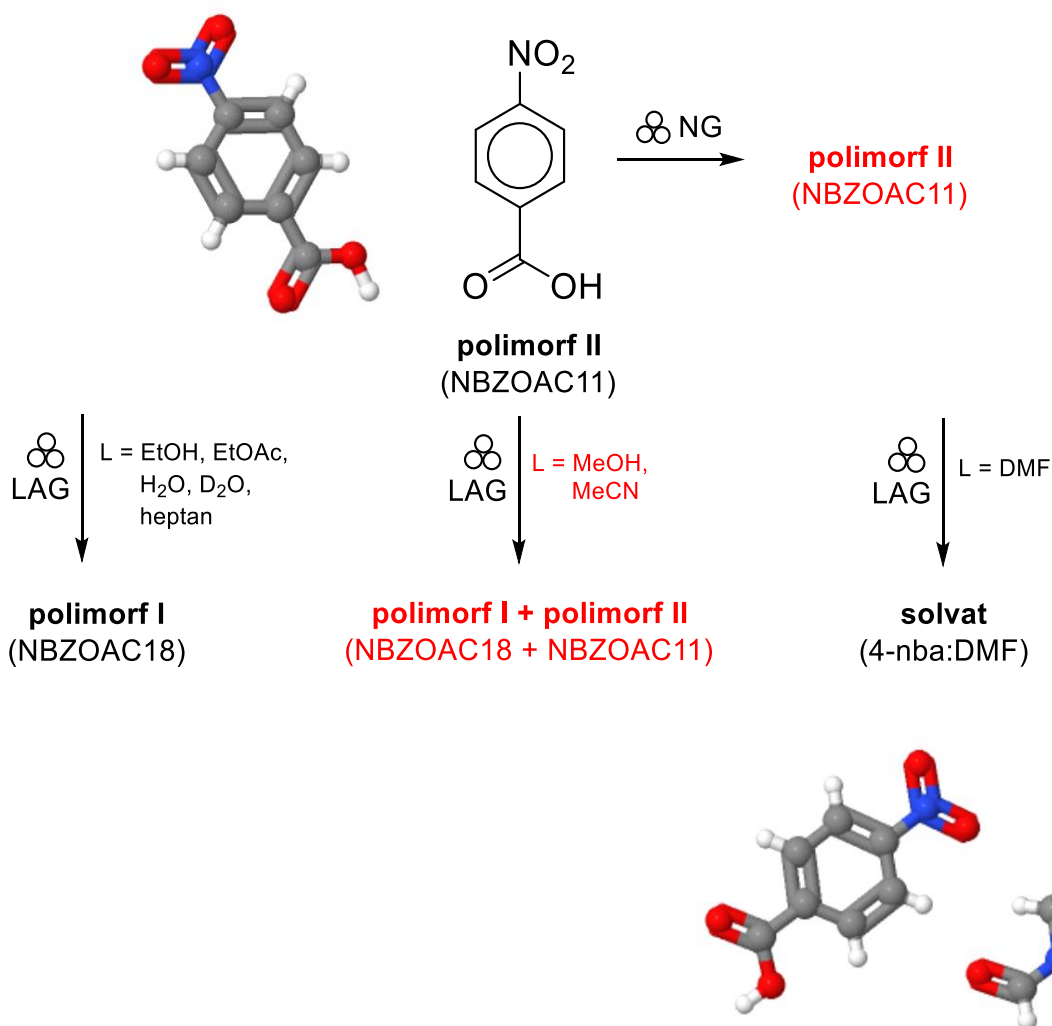
In situ praćenje tijekom mljevenja provedeno je upotrebom prijenosnog Ramanovog spektrometra, modularnog sustava koji se sastoji od spektrometra, laserskog izvora te optičke sonde postavljene ispod posude za mljevenje. Korišteni lasera bio je PD-LD/Necsel snage laserske zrake u rasponu od 10 do 495 mW te valne duljine pobude od 785 nm. Raspršeno zračenje analizirano je pomoću spektrometra Oceanoptics Maya. Svaki spektar prikupljan je 10 s, a prilikom snimanja iz spektra je oduzet doprinos PMMA posude u kojoj su izvođeni pokusi. Spektri su obrađeni u programu *MATLAB*, a tijekom izvođenja eksperimenata u komandnom prozoru definirani su parametri poput: broja spektara koji se prikuplja i uprosječuje (25), snaga lasera (485 mW) te integracijsko vrijeme prikupljanja pojedinog spektra (200 ms). Na početku je određen način izvođenja mjerenja pri čemu je odabran kontinuiran način rada odnosno spektri su sakupljeni u slijedu, jedan za drugim. Prije izvedbe eksperimenata provedena je kalibracija laserske valne duljine, kao i prikupljanje Ramanovih spektara za praznu posudu te proba s posudom i standardom gdje je cilj bio pronaći odgovarajuću udaljenost između sonde i posude. Kao standard korištena je benzojeva kiselina, a cilj izvođenja testnog snimanja je postizanje optimalnih uvjeta za provođenje daljnjih eksperimenata. Valna duljina lasera kalibrirana je prije pokusa pomoću silicija baždarenjem položaja njegovo Ramanske vrpce pri 520 cm⁻¹ uz snagu lasera od 150 mW.

Dobiveni polimorfi karakterizirani su difrakcijom na praškastom uzorku pomoću uređaja PANalytical Aeris koji za snimanje koristi rendgensko zračenje dobiveno na bakrenoj anodi. Rendgenska cijev radila je pri radnom naponu od 40 kV, a katoda je grijana strujom jakosti

7,5 mA. Uzorci su za snimanje pripremljeni u tankom sloju na pločici od silicija, a difraktogrami su snimani u kutnom području od 3 do 45° u 2θ uz korak od 0,02°. Analiza difraktograma obavljena je računalnim programom TOPAS.

3.2. Priprava polimorfa 4-nba

Priprava polimorfa 4-nba u uvjetima suhog mljevenja te tekućinom-potpomognutog mljevenja prikazana je na Shemi 8. Kristalografski podaci za mehanokemijski pripravljene polimorfe 4-nba dani su u Tablici 3.



Shema 7. Priprava polimorfa 4-nba u uvjetima suhog mljevenja te tekućinom-potpomognutog mljevenja.

Tablica 3. Kristalografski podaci za mehanokemijski pripravljene polimorfe 4-nba.

Polimorf	CSD oznaka	Prostorna grupa	Jedinična ćelija
Polimorf II	NBZOAC11	$P2_1/n$	$a = 5,427 \text{ \AA}, b = 5,187 \text{ \AA}, c = 24,662 \text{ \AA}$
			$\alpha = 90^\circ, \beta = 96,069(16)^\circ, \gamma = 90^\circ$
Polimorf I	NBZOAC18	$C2/c$	$a = 20,954 \text{ \AA}, b = 5,022 \text{ \AA}, c = 12,837 \text{ \AA},$
			$\alpha = 90^\circ, \beta = 97,128^\circ, \gamma = 90^\circ$
Solvat	XIYFUJ	$P\bar{1}$	$a = 6,210 \text{ \AA}, b = 7,286 \text{ \AA}, c = 12,512 \text{ \AA}$
			$\alpha = 101,896^\circ, \beta = 99,8670^\circ, \gamma = 91,650^\circ$

3.2.1. Priprava polimorfa 4-nba u suhim uvjetima

U jednu polovicu reakcijske posude od nehrđajućeg čelika izvagan je uzorak 4-nba (250,68 mg, 1,5 mmol), dok su u drugu polovicu stavljene dvije čelične kuglice od 7,0 mm (mase 1,3 g). Dobivena smjesa nakon 45 min mljevenja, sastrugana je sa stijenke posude te je snimljen difraktogram dobivenog produkta.

3.2.2. Priprava polimorfa 4-nba metodom LAG

U jednu polovicu reakcijske posude od nehrđajućeg čelika izvagan je uzorak 4-nba (250,68 mg, 1,5 mmol), dok su u drugu polovicu stavljene dvije čelične kuglice promjera 7,0 mm (mase 1,3 g) te odgovarajući volumeni otapala (0,9 mmol).

Eksperiment za ispitivanje utjecaja otapala na brzinu polimorfnih modifikacija proveden je mljevenjem 4-nba s MeOH čiji su volumeni odgovarali prethodno dodanim volumenima H₂O i EtOH (Tablica 4). Dobivena smjesa sastrugana je sa stijenke posude te je snimljen difraktogram dobivenog produkta.

Tablica 4. Prikaz eksperimentalnih podataka o dodanim volumenima otapala, masi dodanog reaktanta te vremenu trajanja reakcije.

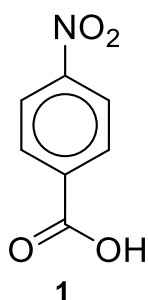
Tekućina	V (tekućine) / μL	m (4-nba) / mg	t / min
MeOH	36,4 / 16 / 52,5	250,68	45
EtOH	52,5		
MeCN	47,0		
H₂O	16,2		
D₂O	16,0		
EtOAc	88,0		
DMF	70,0		
heptan	132,0		
suho mljevenje	–		

4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. Cilj rada

Cilj ovog rada bio je ispitati mogućnost nastajanja novih polimorfnih oblika 4-nba mljevenjem u suhim uvjetima te uz dodatak tekućine. Suhim mljevenjem 4-nba nije primijećena polimorfna transformacija dok je uz dodatak etanola, etil-acetata, H₂O, D₂O i heptana priređen polimorf I iz početnog polimorfa II. Uz dodatak DMF-a kao otapala izoliran je solvat, dok je uz dodatak metanola i acetonitrila dobivena smjesa polimorfa I i polimorfa II. Računalnim modeliranjem procijenjena je podudarnost između računski dobivenih informacija o energetskej stabilnosti polimorfa i eksperimentalnog ishoda reakcija.

Strukture pripremljenih polimorfa potvrđene su rendgenskom difrakcijom na praškastom uzorku kao i Ramanovom spektroskopijom *in situ*. Uz pomoć programa TOPAS provedeno je indeksiranje snimljenih difraktograma te potom utočnjavanje jedinične ćelije.



Slika 21. Molekulska struktura ispitivanog organskog spoja.

4.2. Mehanosinteza polimorfa

Polimorfi se razlikuju u rasporedu atoma ili atomskih skupina u prostoru kristalne rešetke što utječe na različita fizikalna svojstva poput topljivosti, tališta, kemijske stabilnosti, optičkih i električnih karakteristika. Optimalnim izborom uvjeta kristalizacije, otapala i aditiva, ali i uz računalne metode te mogućnost uvida u informacije o eksperimentalno održivim kristalnim oblicima može se utjecati na modulaciju rasta određenog polimorfa. Primarni način prepoznavanja različitosti između polimorfa je provedba analize pakiranja strukura gdje zbog razlika u pakiranju postoje i odgovarajuće razlike u energijama kristalne rešetke te stabilnosti polimorfa. Općenito, polimorfne transformacije odvijaju se ovisno o energetske preprekama i prijelaznim uvjetima odnosno odstupanju od točke u kojoj su obje polimorfne faze u ravnoteži te imaju jednaku Gibbsovu energiju. Promjena kristalne faze u termodinamički stabilniji oblik rezultat je pomaka od ravnotežnih uvjeta, a računalnim modeliranjem moguće je dobiti podatak o energijama polimorfa i unaprijed zaključiti o eksperimentalno mogućim konverzijama i ishodima.

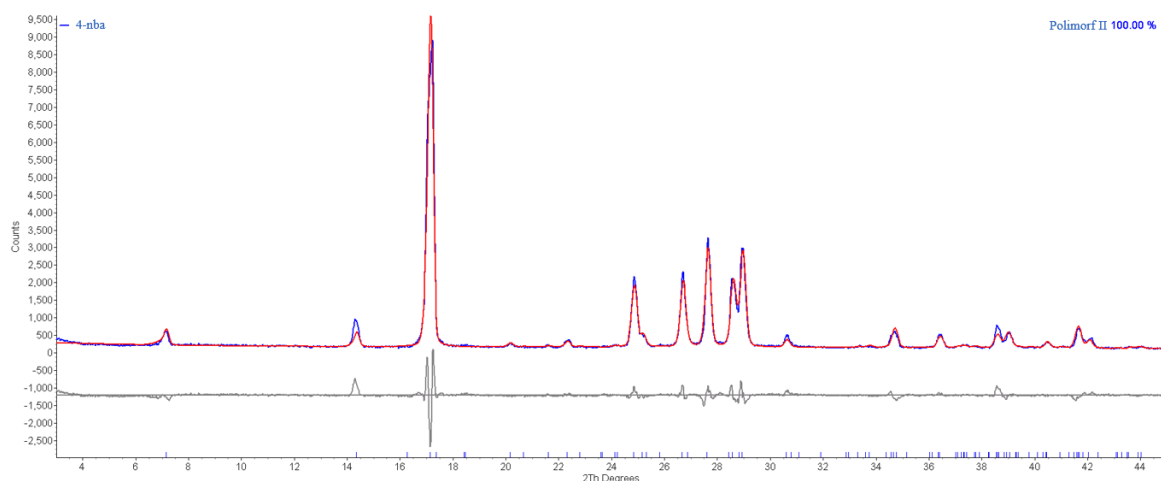
4.2.1. Polimorfi 4-nba

Pretragom kristalografske baze podataka pronađeno je kako postoje 3 poznata polimorfa spoja 4-nba (CSD oznake: NBZOAC11, NBZOAC18, NBZOAC17). Mljevenje uzorka 4-nba rezultira nastankom polimorfa I i II ovisno o reakcijskim uvjetima, a kristalne strukture određene su iz podataka difrakcije rendgenskih zraka na praškastom uzorku. Polimorf III nije izoliran u navedenim uvjetima eksperimenata.

Polimorf I kristalizira u monoklinskom kristalnom sustavu, u prostornoj grupi $C2/c$, dok polimorf II kristalizira u monoklinskom sustavu, u prostornoj grupi $P2_1/c$ s ranije navedenim parametrima. Polimorfe karakterizira ista kemijska struktura, međutim razlikuju se u pakiranju unutar kristala.

Tijekom 45 minuta mljevenja u uvjetima LAG s etanolom, etil-acetatom, vodom, heptanom i teškom vodom nastaje kao produkt čista faza polimorfa I dok reakcija s metanolom i acetonitrilom daje smjesu polimorfa I i polimorfa II. Također, mljevenjem 4-nba s DMF-om dobiven je solvat, dok je u uvjetima suhog mljevenja zadržana kristalna faza početnog polimorfa II.

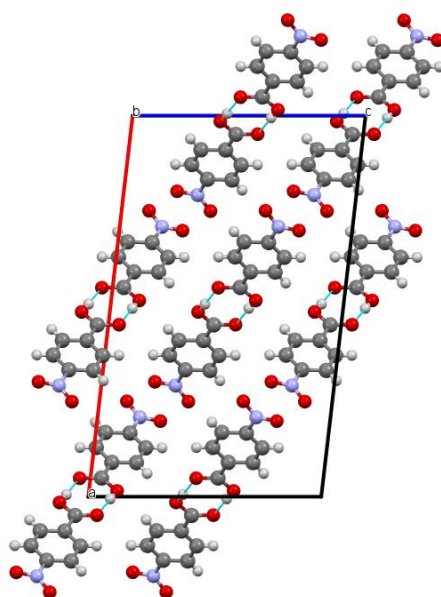
Struktura početnog uzorka 4-nba potvrđena je na temelju podataka dobivenih difrakcijom na praškastom uzorku te je utvrđena jedinična ćelija polimorfa II čiji su parametri sljedeći: $a = 5,427 \text{ \AA}$, $b = 5,187 \text{ \AA}$, $c = 24,662 \text{ \AA}$, $\beta = 96,069(16)^\circ$ (Slika 22). Iz dostupne baze podataka preuzete su datoteke pomoću kojih je uzorak 4-nba okarakteriziran.



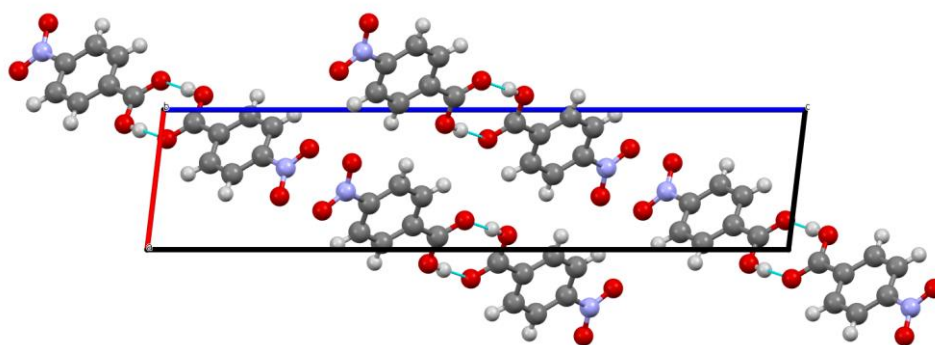
Slika 22. Difraktogram praha početnog uzorka 4-nba modeliran Rietveldovom metodom.

Plavo – eksperimentalni podaci, crveno – utočnjeni, izračunati podaci, sivo – razlika.

Derivat benzojeve kiseline, 4-nba, sadrži donor i akceptor vodikove veze te u čvrstom stanju postoji u obliku dimera budući da u kristalnoj strukturi tvori dvije intermolekulske vodikove veze između karboksilnih skupina. Molekule 4-nba povezane su intermolekulskim C—H \cdots O interakcijama u lancu duž osi b, pri čemu se lanci slažu duž osi c putem π - π interakcija (Slike 23 i 24).

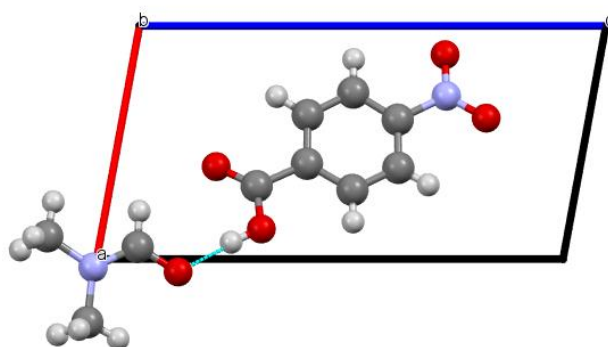


Slika 23. Intermolekularne interakcije duž kristalografske osi b za polimorf I.



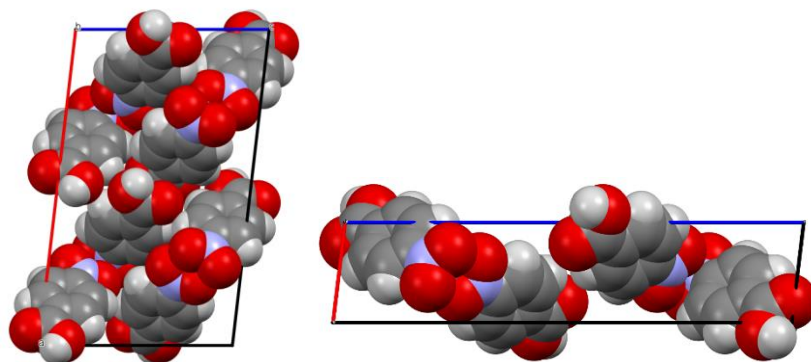
Slika 24. Intermolekularne interakcije duž kristalografske osi b za polimorf II.

Molekule 4-nba povezuju se dipolnim interakcijama, a usmjerene vodikove veze kidaju se tijekom mljevenja početnog spoja uz dodatak DMF-a pri čemu se DMF inkorporira u kristalnu strukturu 4-nba te kisikov atom karbonilne skupine DMF-a postaje novi akceptor vodikove veze prema karboksilnoj skupini 4-nba. Na slici 25 prikazana je nova vodikova veza između vodikovog atoma karboksilne skupine 4-nba i kisikovog atoma karbonilne skupine DMF-a.



Slika 25. Vodikova veza između molekule DMF-a i 4-nba.

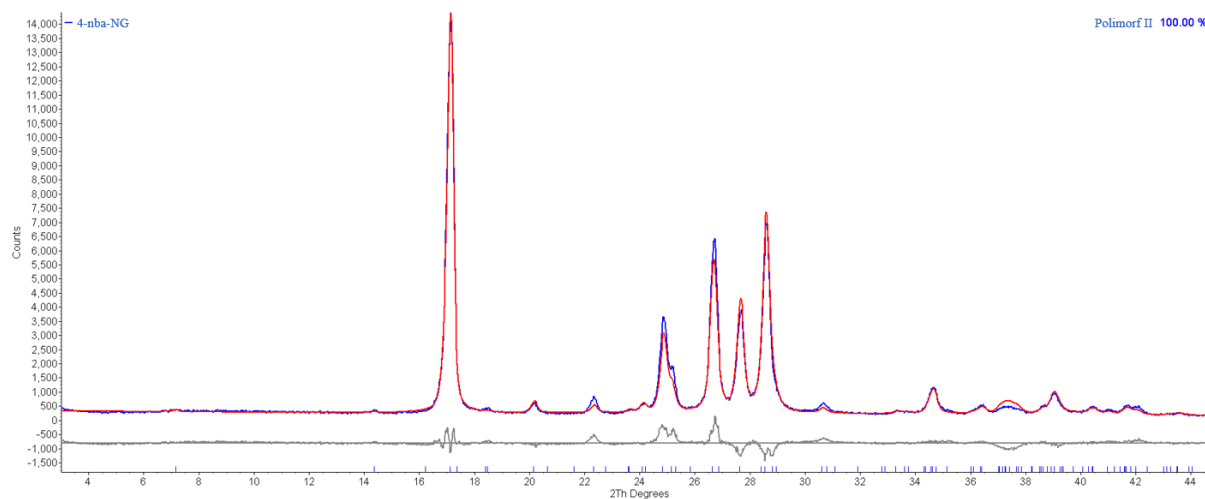
Dodatno, uspoređene su i razlike u gustoći pakiranja između polimorfa I i II pri čemu je vidljiva veća gustoća polimorfa I u odnosu na polimorf II odnosno volumen jedinične ćelije polimorfa I iznosi $690,4 \text{ \AA}^3$, a polimorfa II $1340,4 \text{ \AA}^3$ (Slika 26). Kvantno-mehaničkim modeliranjem potvrđena je veća stabilnost polimorfa I na temelju izračuna energije kristalne rešetke što je u skladu s pravilom da je gusto kristalno pakiranje uzrok veće stabilnosti polimorfa.



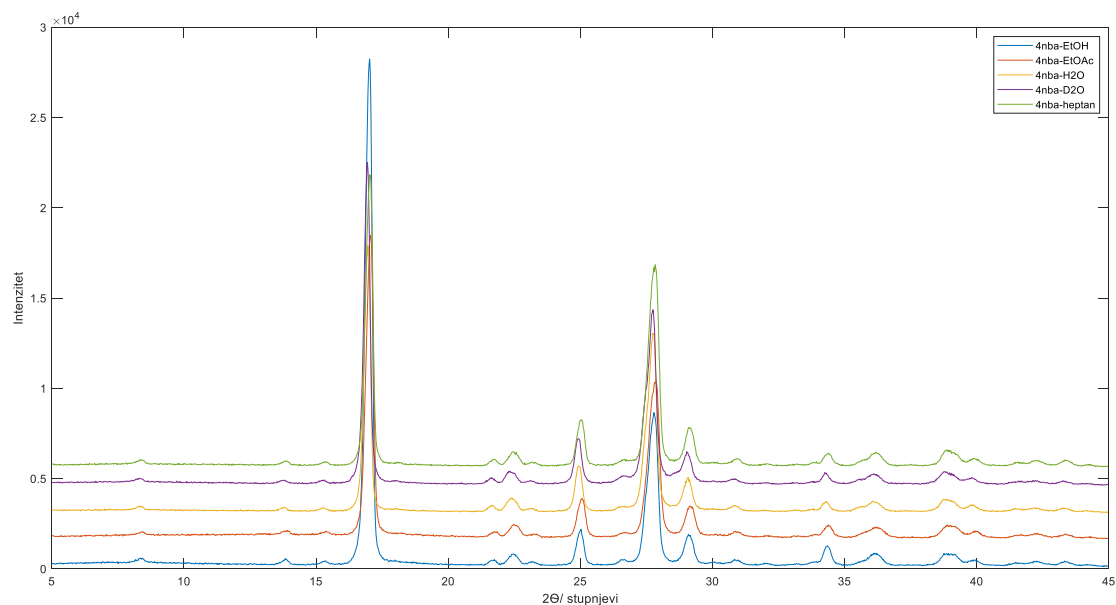
Slika 26. Pakiranje molekula polimorfa II (lijevo) i polimorfa I (desno) unutar jedinične ćelije.

Difraktogrami praha korišteni su za rješavanje kristalne strukture provođenjem kvalitativne Rietveldove analize. Mljevenjem 4-nba bez dodatka tekućine kao produkt dobiva se čista faza odnosno polimorf II koji kristalizira u monoklinskoj prostornoj grupi $P2_1/c$, a njegov je difraktogram prikazan na Slici 27.

Nadalje, na Slici 28 prikazani su difraktogrami polimorfa I čiji je uzorak pripremljen mehanokemijskom tekućinom-potpomognutom reakcijom spoja 4-nba te EtOH, EtOAc, H₂O, D₂O i heptanom.

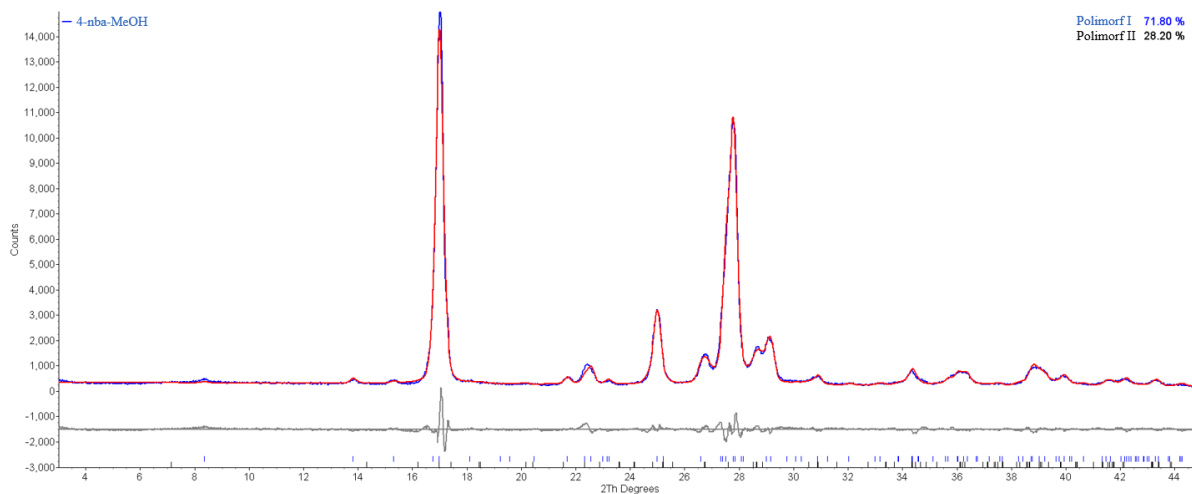


Slika 27. Difraktogram praha uzorka 4-nba dobivenog u uvjetima suhog mljevenja modeliran Rietveldovom metodom. Plavo – eksperimentalni podaci, crveno – utočnjeni, izračunati podaci, sivo – razlika.

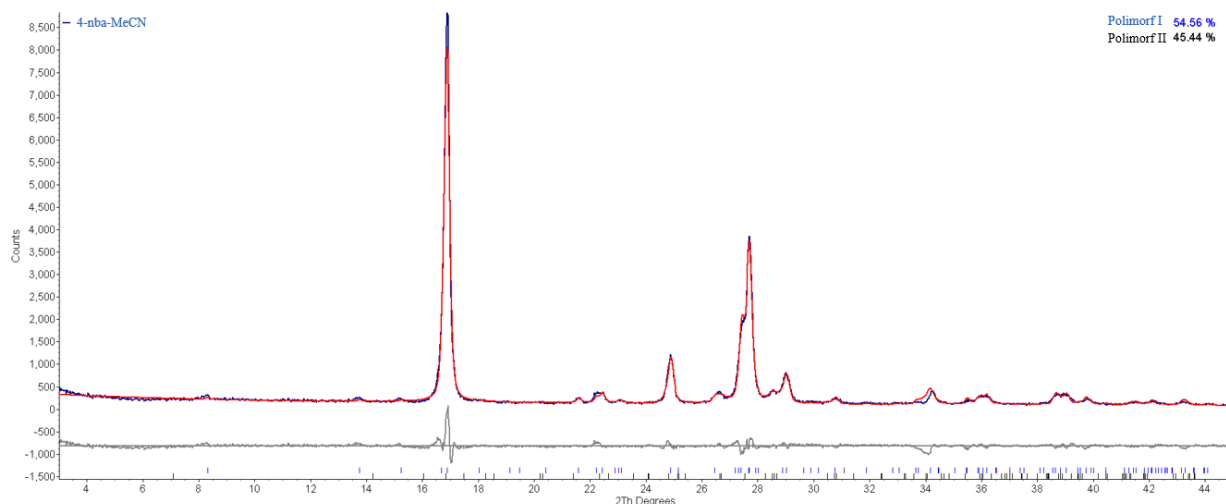


Slika 28. Difraktogrami praha polimorfa I dobivenog u LAG uvjetima s etanolom, etil-acetatom, H₂O, D₂O i heptanom modelirani Rietveldovom metodom.

U LAG uvjetima, uz dodatak MeOH i MeCN nastaje smjesa dviju faza, početnog polimorfa II i nove faze polimorfa I što je utvrđeno difrakcijom na prahu (Slike 29 i 30).

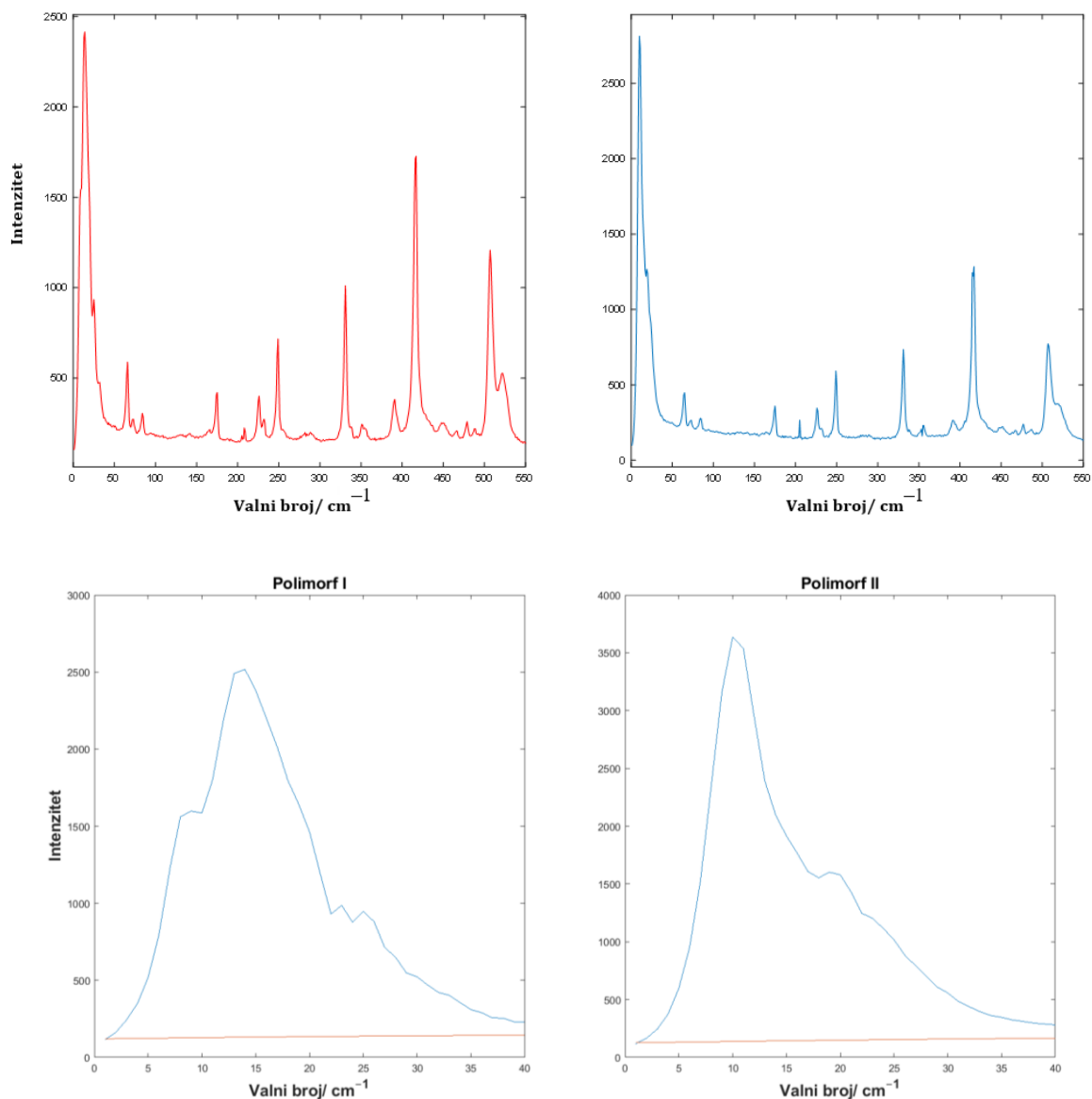


Slika 29. Difraktogram praha uzorka 4-nba dobivenog u LAG uvjetima s metanolom modeliran Rietveldovom metodom. Plavo – eksperimentalni podaci, crveno – utočnjeni, izračunati podaci, sivo – razlika.



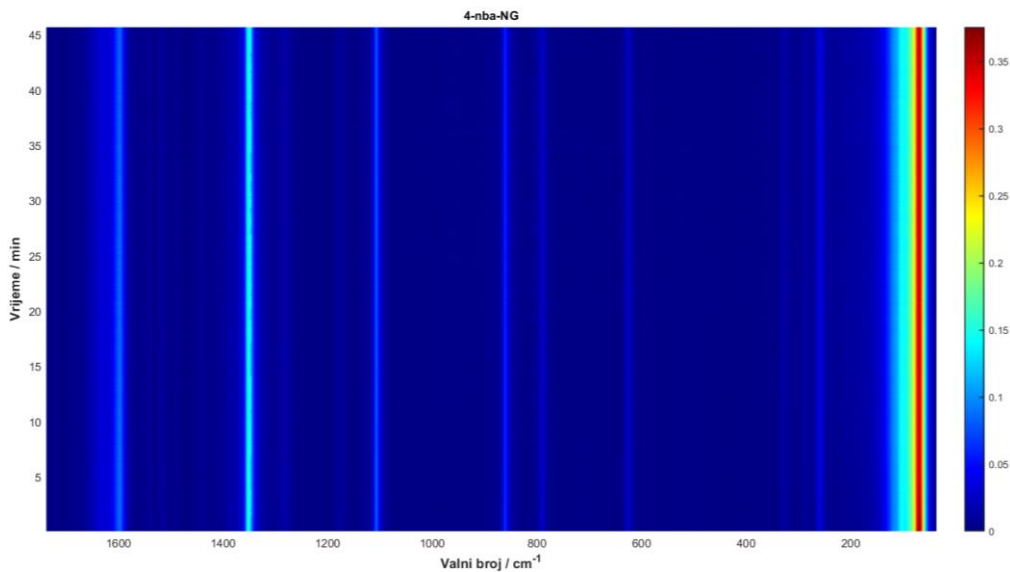
Slika 30. Difraktogram praha uzorka 4-nba dobivenog u LAG uvjetima s acetonitrilom modeliran Rietveldovom metodom. Plavo – eksperimentalni podaci, crveno – utočnjeni, izračunati podaci, sivo – razlika.

Praćenjem polimorfnih transformacija Ramanovom spektroskopijom *in situ* omogućen je uvid u kinetiku nastanka polimorfa. Promjene se uočavaju pri niskim valnim brojevima u fononskoj regiji između $50 - 100 \text{ cm}^{-1}$ koja se odnosi na vibracije kristalne rešetke te se identificira kao "područje otiska prsta". Niskofrekventno područje Ramanovog spektra korisno je za karakterizaciju i identifikaciju razlika između polimorfničkih oblika, budući da se mijenjaju razlike u vibracijama, a molekula ostaje ista kod polimorfne transformacije. Mijenja se pakiranje molekula što će najveći utjecaj imati na vibracije rešetke uslijed promjene u interakcijama između molekula u kristalima dvaju polimorfa. Vibracije kristalne rešetke koje uključuju kolektivne oscilacije molekula unutar jedinične ćelije odvijaju se pri niskim frekvencijama upravo zbog velike mase molekula koje se kolektivno gibaju. S obzirom na to da različiti polimorfi sadrže iste funkcionalne skupine, Ramanova spektroskopija indirektna je metoda koja omogućuje njihovo razlikovanje. Iako su međumolekulske interakcije između molekula 4-nba u dvama polimorfina slične, razlike u pakiranju uzorkuju različite vibracije u fononskoj regiji što se očituje promjenama u položaju i relativnim intenzitetima pojedinih vrpca. Iako su fononske vrpce teške za mjerenje zbog toga što se nalaze blizu pubudne valne duljine lasera, u području od 10 do 30 cm^{-1} uočavaju se vrpce po kojima se polimorfi međusobno razlikuju pri čemu polimorf I sadrži karakteristične vrpce na položajima $14, 25, 31 \text{ cm}^{-1}$ dok polimorf II na položajima 10 i 19 cm^{-1} (Slika 31). Razlike u položajima vrpca mogu se bolje uočiti što je veća rezolucija snimljenih spektara.



Slika 31. Ramanovi spektri polimorfa I (crveno) i polimorfa II (plavo) u području od 0 do 550 cm⁻¹ (gornji prikaz) te od 0 do 40 cm⁻¹ (donji prikaz).

Praćenjem reakcije u uvjetima suhog mljevenja zaključeno je kako početni polimorf II ne mijenja svoju kristalnu strukturu te da Ramanov spektar odgovara Ramanovom spektru polimorfa II (Slika 32). Drugim riječima, ne uočavaju se promjene u vrpcama tijekom vremena.



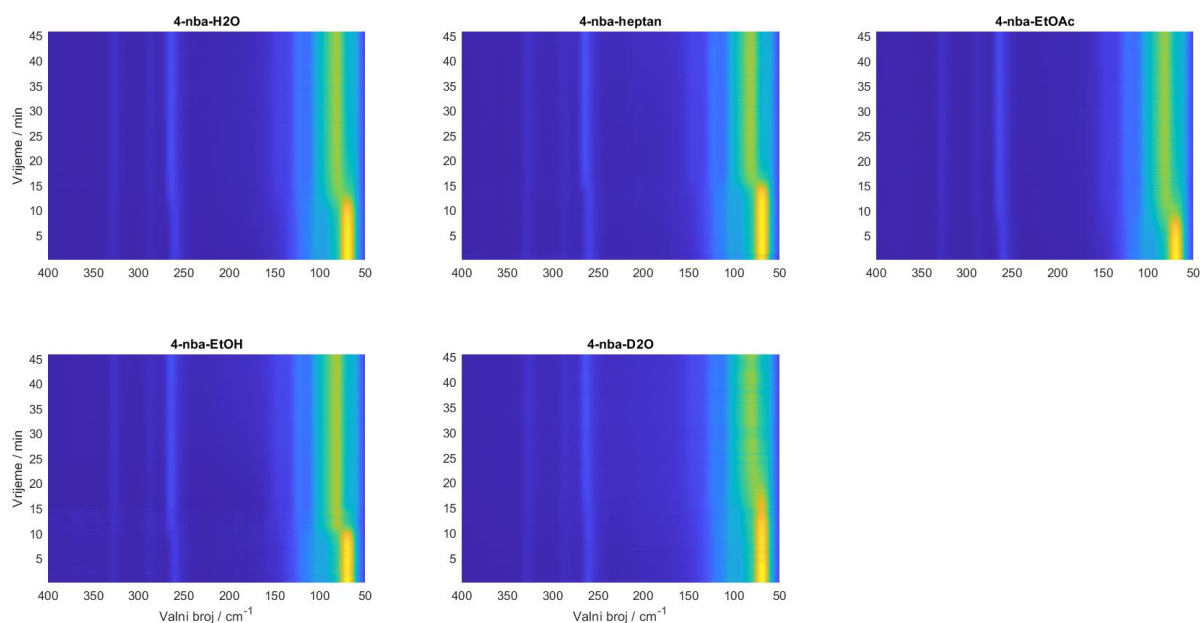
Slika 32. Vremenski razlučeni Ramanovi spektri tijekom mljevenja 4-nba u LAG uvjetima u suhim uvjetima.

Reakcijom u LAG uvjetima s etanolom, etil-acetatom, vodom, heptanom i teškom vodom pripremljen je polimorf I. Na Slici 34 prikazani su 2D vremenski razlučeni Ramanovi spektri na kojima je vidljivo kako polimorf I direktno nastaje unutar 5-15 min od početka reakcije ovisno o dodanoj tekućini.

U Ramanovim spektrima prikazanim na Slici 33, vidljive su karakteristične vrpce koje kvalitativno mogu ukazivati na tijek reakcije te se odnose na smanjenje intenziteta vrpce pri 68 i 261 cm^{-1} odnosno trošenje polimorfa II, dok se povećanje intenziteta vrpce pri 83, 146, 265, 285 i 329 cm^{-1} odnosi na nastajanje polimorfa I. Brzinu prijelaza iz polimorfa II u polimorf I odokativno je moguće odrediti u području pri jako niskim valnim brojevima pri čemu se zaključuje kako je polimorfna transformacija najbrža uz korištenje etil-acetata kao otapala odnosno najsporija uz heptan. S obzirom na to da su korištene jednake množine otapala, različiti dodani volumen mogao je ostvariti utjecaj na kinetiku, ali i na sintezu specifične polimorfne forme budući da je opaženo usmjeravanje polimorfije varijacijom volumena iste tekućine. Drugim riječima, selektivnost za nastajanje pojedinog polimorfa ne ovisi samo o vrsti tekućine nego i dodanom volumenu, tj. o omjeru mase čvrstog početnog polimorfa i volumena dodane tekućine.

Nadalje, promatrajući područje od $400\text{ do }1600\text{ cm}^{-1}$ za polimorf I, uočavaju se promjene u intenzitetu vrpce, a najintenzivnije vrpce te njihova asignacija prikazana je u Tablici 5. Najintenzivnije vrpce nalaze se u području od $1110\text{ do }1290\text{ cm}^{-1}$ koje odgovaraju C-O-Ar

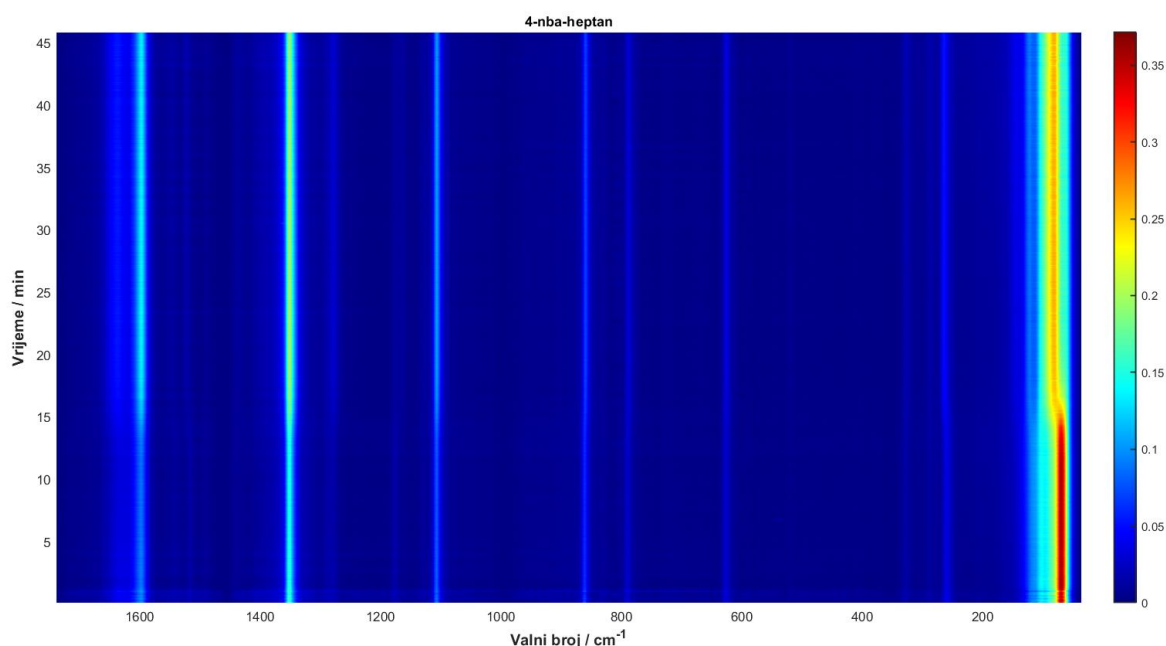
istezanju veza, a primjer spektra snimljenog za vrijeme monitoringa *in situ* u LAG uvjetima s dodatkom heptana prikazan je na Slici 34.



Slika 33. Vremenski razlučeni Ramanovi spektri tijekom mljevenja 4-nba u LAG uvjetima uz dodatak vode, heptana, etil-acetata, etanola i teške vode u fononskog regiji od 50 do 400 cm^{-1} .

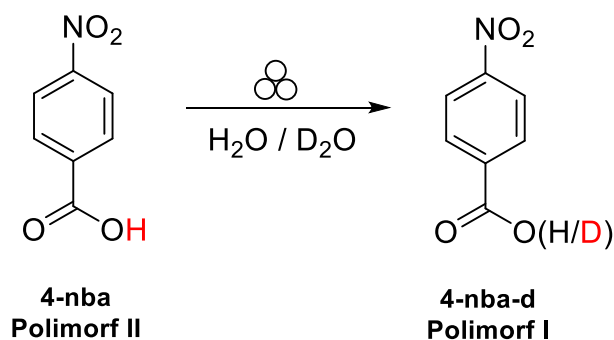
Tablica 5. Asignacija karakterističnih Ramanovih vrpca polimorfa I u čvrstom stanju.

Skupina i tip vibracije	ν / cm^{-1}	
	Polimorf I	Polimorf II
C-H aromatsko savijanje (<i>para</i> supstitucija) – deformacija van ravnine	800, 860	860
C-C istežanje (sp^3)	1280	1283
C=C istežanje (sp^2)	1598	1601
C=O istežanje	1640	1635
C-O istežanje	1107	1107
O-H istežanje	800, 860	860
C-O-Ar istežanje, N=O istežanje	1353	1350
C-N istežanje	1165	1168



Slika 34. Vremenski razlučeni Ramanovi spektri tijekom mljevenja 4-nba u LAG uvjetima uz heptan.

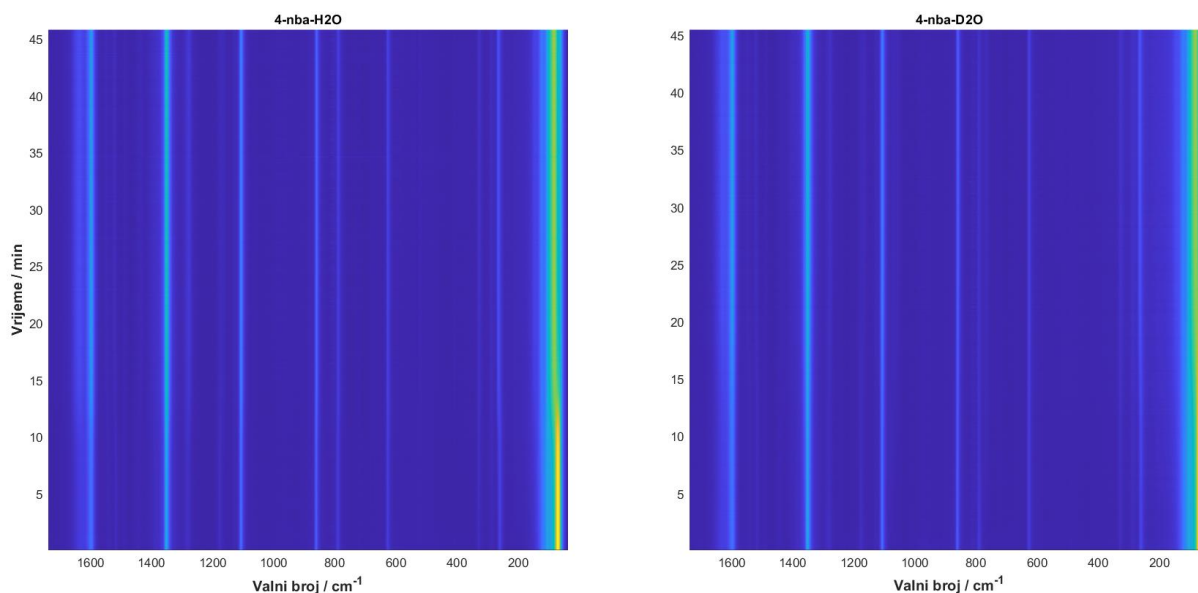
Mljevenjem 4-nba u prisutnosti H₂O odnosno D₂O i praćenjem prisutnih transformacija Ramanovom spektroskopijom u realnom vremenu, primijećeno je istodobno odvijanje polimorfne konverzije te izmjene atoma vodika karboksilne skupine i s deuterijem iz teške vode (Schema 9).



Schema 8. Transformacija polimorfa II u polimorf I uz dodatak H₂O odnosno D₂O.

Izotopne izmjene vodika i deuterija uočavaju se putem promjena u intenzitetu vibracija u Ramanovim spektrima. Primijećuje se porast intenziteta vibracijske vrpce pri 767 i 1100 cm⁻¹ nakon 5 min od početka reakcije što odgovara O-D istežanju veza karboksilne skupine spoja 4-nba-d. Vibracijska vrpca istežanja O-H skupine spoja 4-nba nalazi se na 800 cm⁻¹ te se njezin intenzitet smanjuje s vremenom tijekom mljevenja s teškom vodom (Slika 35). H/D izmjene uključuju kidanje kemijskih veza ovisno o veličini energetske barijere, ali i o radnoj temperaturi

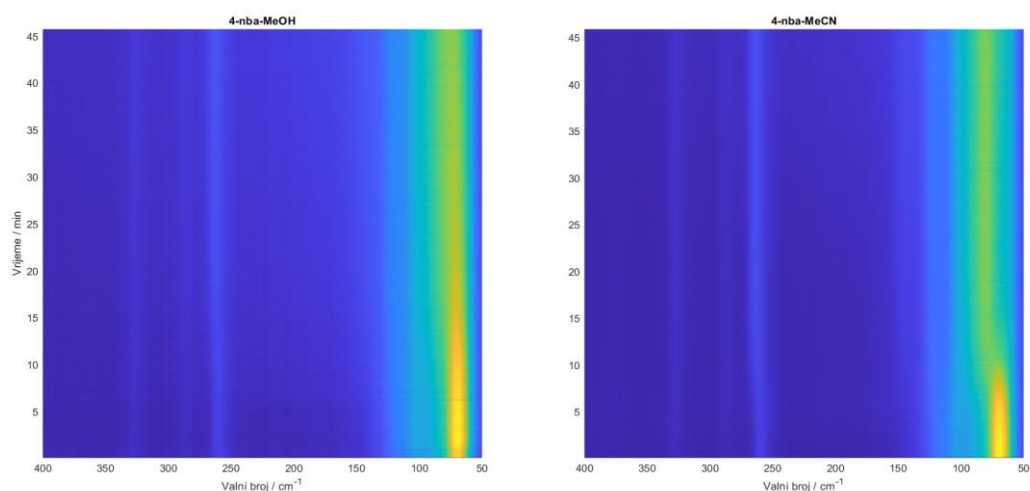
stoga se daljnja serija eksperimenata i proučavanja može orijentirati u tom smjeru. Zaključno, mljevenjem 4-nba s teškom vodom dolazi do brze izmjene atoma vodika tijekom kontinuiranog usitnjavanja čestica pri čemu površina postaje lako dostupna dodanoj tekućini koja omogućava brzu difuziju, kao i promoviranje izotopne izmjene.



Slika 35. Vremenski razlučeni Ramanovi spektri tijekom mljevenja 4-nba u LAG uvjetima uz H₂O i D₂O.

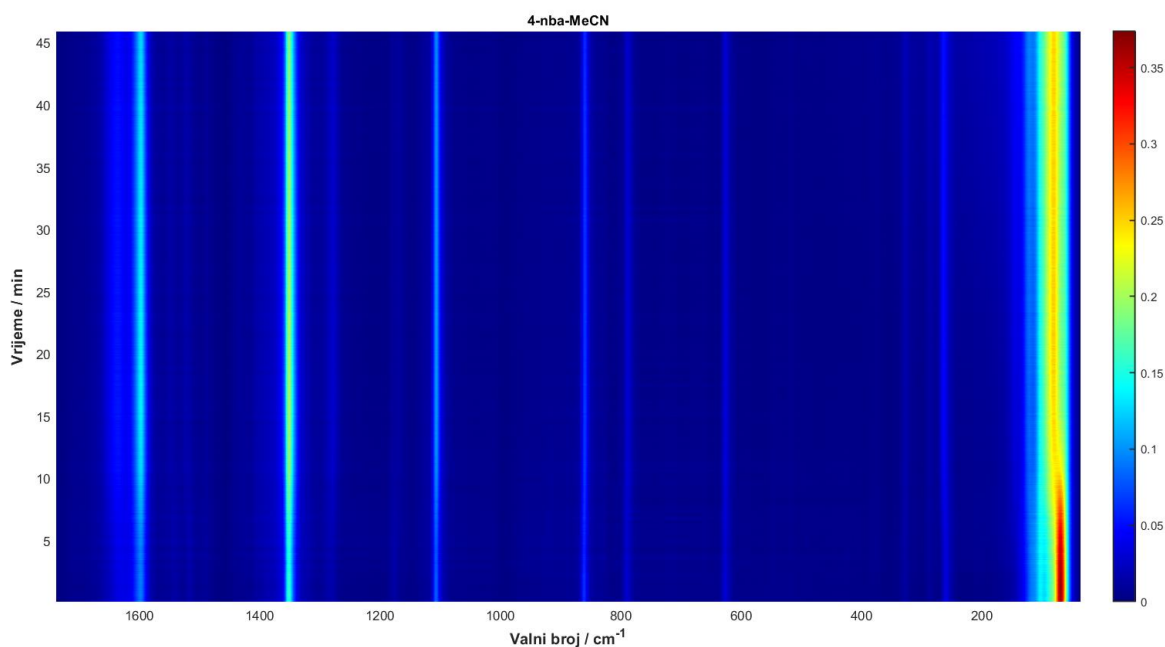
S druge strane, mljevenje 4-nba uz dodatak MeOH i MeCN rezultiralo je smjesom početnog polimorfa II i polimorfa I. U Ramanovim spektrima ne uočavaju se značajnije razlike u vrpca za spoj 4-nba-MeOH, dok se za spoj 4-nba-MeCN uočava smanjenje intenziteta vrpce pri 68 i 261 cm⁻¹ odnosno povećanje intenziteta vrpce pri 83 i 265 cm⁻¹ što indicira nastanak polimorfa I (Slika 36).

Mljevenjem uz dodatak MeOH te praćenjem Ramanovom spektroskopijom *in situ* vidljivo je smanjenje intenziteta vrpce pri 72 cm⁻¹ što ukazuje na trošenje polimorfa II, ali i blago povećanje intenziteta vrpce pri 261 cm⁻¹. Povećanje vremena reakcije, promjena materijala i mase korištenih kuglica za mljevenje te množinskog omjera reaktanata neke su od ideja za provedbu potencijalno uspješnije konverzije.



Slika 36. Vremenski razlučeni Ramanovi spektri tijekom mljevenja 4-nba u LAG uvjetima uz metanol i acetonitril u fononskoj regiji od 50 do 400 cm^{-1} .

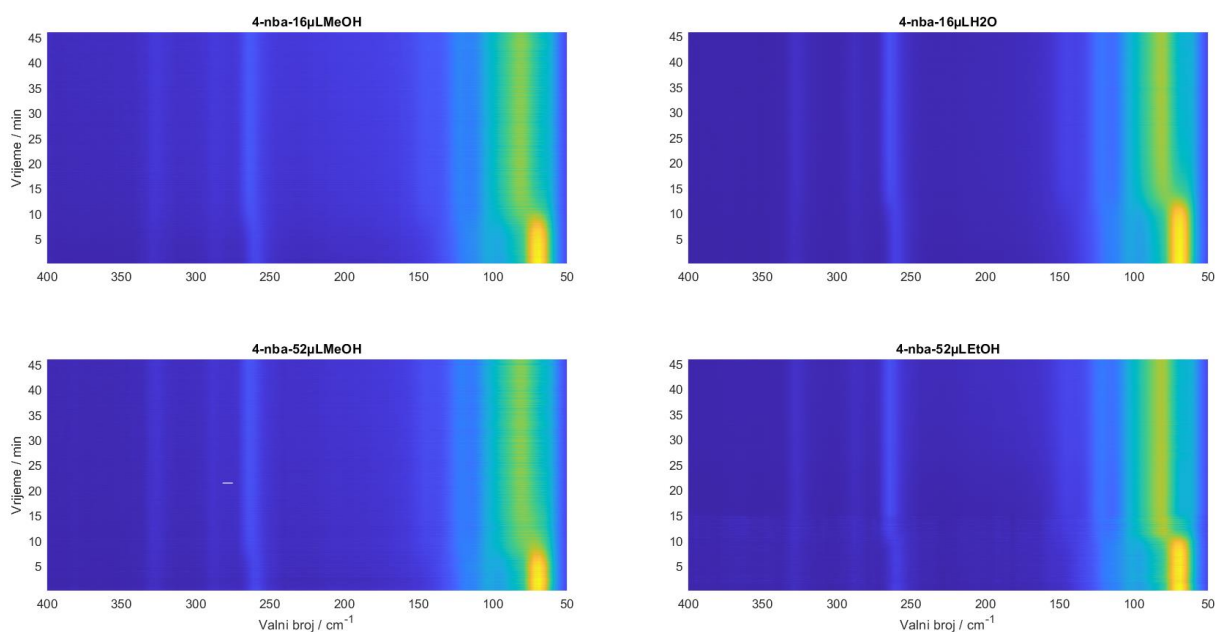
U području od 400 do 1600 cm^{-1} u LAG uvjetima uz dodatak MeOH ne primjećuju se značajnije promjene, dok je uz dodatak MeCN vidljivo povećanje intenziteta vrpce pri 864, 1168, 1283, 1353 i 1635 cm^{-1} što odgovara C-H aromatskom savijanju veza, C-N i C-C aromatskom istezanju te C-O-Ar, N=O i C=O istezanju veza (Slika 37).



Slika 37. Vremenski razlučeni Ramanovi spektri tijekom mljevenja 4-nba u LAG uvjetima uz acetonitril.

Na temelju prikazanih spektara, vidljiv je utjecaj različitog volumena tekućina na napredovanje reakcije. Vrlo mala količina dodanih tekućina (0,9 mmol) ubrzava difuziju čestica i procese

nukleacije, a u Ramanovim spektrima njihove se vrpce ne uočavaju što upućuje na aktivno sudjelovanje otapala u nastanku polimorfa. Utjecaj tekućina na brzinu reakcije nije jednoznačan, jer međumolekulske interakcije između tekućine i reaktanta, priroda tekućina te utjecaj većih količina tekućih aditiva mogu biti faktori koji uzrokuju porast u brzini reakcije. Kako bi se ispitao utjecaj množina tekućine na brzinu polimorfne transformacije provedeno je mljevenje 4-nba uz dodatak jednakih volumena, ali različitih množina MeOH i H₂O odnosno MeOH i EtOH (Slika 38).



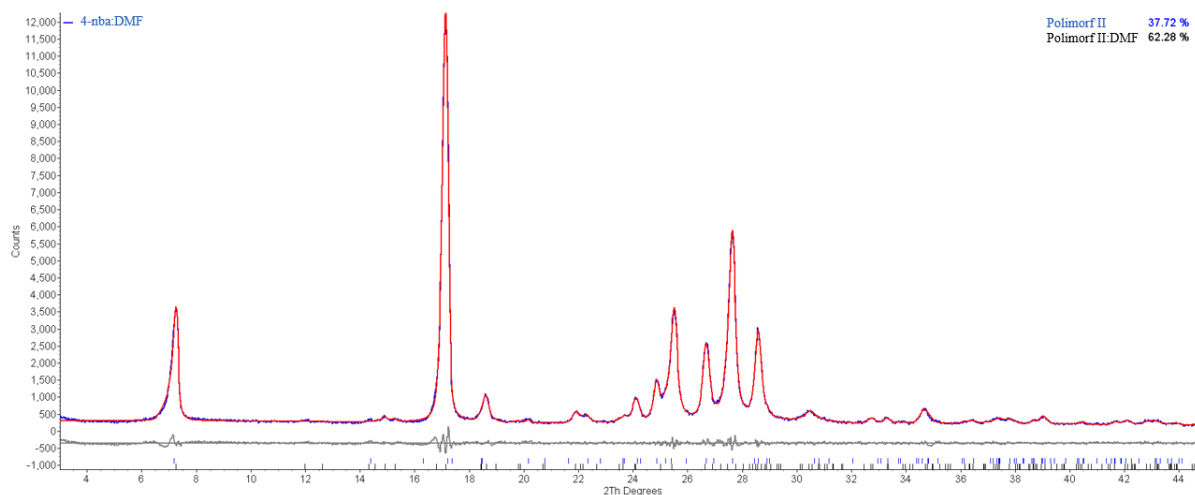
Slika 38. Vremenski razlučeni Ramanovi spektri tijekom mljevenja 4-nba u LAG uvjetima uz dodatak 16 μL MeOH i H₂O te 52 μL MeOH i EtOH.

Uspoređujući brzinu reakcije na temelju prikazanih vremenski razlučenih Ramanovih spektara vidljiva je veća brzina reakcije uz dodatak 16 μL MeOH (0,4 mmol) nego pri istom volumenu polarnijeg otapala H₂O (0,9 mmol). Drugim riječima, kvalitativni napredak reakcije indicira smanjenje vrpce pri 71 cm⁻¹ odnosno porast intenziteta vrpce pri 82 cm⁻¹ koja odgovara konverziji polimorfa II u polimorf I. Pretpostavlja se, kako je reakcija brža u slučaju manje polarnog sustava, jer je potrebno utrošiti manje energije za kidanje nastalih vodikovih veza zbog čega je difuzija olakšana, a proces polimorfne transformacije brži.

S druge strane vidljiva je veća brzina reakcije uz dodatak 52 μL MeOH (1,3 mmol) nego pri istom volumenu manje polarnog EtOH (0,9 mmol). Navedeno se može objasniti na temelju molekulske mase budući da manje molekule otapala teže mogu dovesti do zasićenja površine reaktanta te je time proces transformacije učinkovitiji.

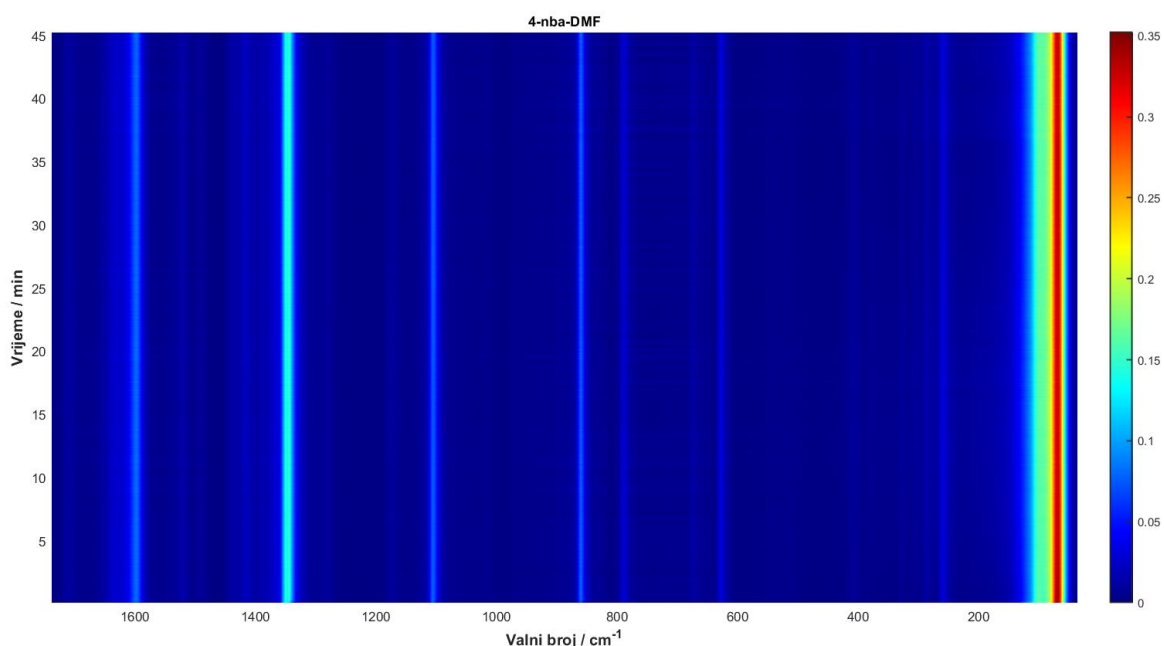
Mljevenje 4-nba (polimorf II) uz dodatak 46 μL MeOH (0,9 mmol) rezultiralo je nastankom dviju faza odnosno polimorfom I i II te nisu uočene karakteristične promjene u intenzitetima vrpce u području fononske regije u Ramanovim spektrima. Navedeno upućuje na to da se ovisno o dodanom volumenu određene tekućine može kontrolirati i usmjeravati reakcija prema nastanku određenog polimorfa. Različiti dipolni momenti odnosno polarnost otapala, molekulske mase i dodani volumeni bitni su čimbenici koji utječu na kinetiku, ali i na selektivnost reakcije prema specifičnom polimorfu.

Provođenjem mehanokemijske reakcije, mljevenjem početnog organskog spoja 4-nba uz dodatak DMF-a, rendgenskom difrakcijom na prahu potvrđen je nastanak solvata (Slika 39). Otapalo se ugrađuje u jediničnu ćeliju 4-nba, a naknadnim postupcima desolvatacije moguće je ukloniti tekućinu te izolirati početni polimorf II. Osim toga, provođenjem reakcije u ekvivalentnom omjeru početnog spoja i tekućine moguće je dobiti čistu fazu solvata. Solvati imaju različitu topljivost, mehaničko ponašanje i biodostupnost od nesolvatiranih analoga, a u farmaceutskoj industriji nastoje se sintetizirati hidrati budući da je voda benigna u odnosu na druge vrste otapala. S druge strane, prilikom izlaska otapala iz jedinične ćelije mogu zaostati šupljine te takav proizvod može pokazati sklonost pucanju. U takvim se slučajevima nastoji izbjegavati priprava solvata tijekom formulacije aktivnih farmaceutskih supstanci.



Slika 39. Difraktogram praha uzorka 4-nba dobivenog u LAG uvjetima s DMF-om modeliran Rietveldovom metodom. Plavo – eksperimentalni podaci, crveno – utočnjeni, izračunati podaci, sivo – razlika.

Analiziranjem Ramanovih spektara ne uočavaju se značajnije razlike u vrpcama odnosno prilikom mljevenja 4-nba s DMF-om kroz 45 min ne odvija se transformacija u drugi polimorf (Slika 40).



Slika 40. Vremenski razlučeni Ramanovi spektri tijekom mljevenja 4-nba u LAG uvjetima uz DMF.

4.3. Računalno ispitivanje stabilnosti polimorfa 4-nba

Za ispitivanje energetske razlike između polimorfa I i II provedeni su proračuni na računalnom klasteru Isabella na SRCU pomoću programskog paketa *Quantum Espresso 6.3*. Kvantno-mehanički izračuni izvršeni su korištenjem teorije funkcionala gustoće (DFT) s D2 verzijom Grimmeove korekcije za disperzne sile, a upotrebljena aproksimacija za funkcional energije izmjene i korelacije bila je PBE-GGA.^{52,53} Disperzne sile su vrsta Van der Waalsovih interakcija i ostvaruju bitan utjecaj prilikom opisivanja energije i određivanja relativne stabilnosti polimorfa, stoga je uvođenje disperzijskih korekcija korisna nadogradnja za DFT račune.⁵⁴

Optimizirani su parametri kristalne rešetke kao i pozicije atoma pri čemu je inicijalan cilj bio pronaći maksimalnu vrijednost energije ravnih valova, E_{cutoff} i broj k -točaka uz koje će ukupna energija atoma u elementarnoj ćeliji zadovoljavajuće konvergirati. Konvergencija rezultata postignuta je uz bazni set, $E_{cutoff} = 40$ Ry za kinetičku energiju odnosno 400 Ry za gustoću naboja. Uz odgovarajući bazni set, rezultati su konvergirali povećanjem gustoće k -mreže što je vidljivo iz Tablice 6.

Tablica 6. Energetske razlike polimorfa i konvergiranje rezultata ovisno o zadanoj gustoći k -mreže.

	Polimorf		E_{tot} (Ry)		ΔE (Ry)	ΔE (kJ/mol)
	II	I	II	I		
k-broj	5 5 1	3 3 3	-931,706	-931,714	0,00741	9,7
	5 5 1	5 1 5	-931,706	-931,714	0,0075	9,8
	7 7 1	6 2 6	-931,706	-931,714	0,00729	9,6
	8 8 1	7 2 7	-931,706	-931,714	0,00735	9,7
	10 10 2	10 3 10	-931,706	-931,714	0,00733	9,6
	12 12 2	12 4 12	-931,706	-931,714	0,00733	9,6
	14 14 3	14 5 14	-931,706	-931,714	0,00734	9,6

Iz Tablice 6 vidljiva je veća stabilnost polimorfa I s obzirom na nižu energiju što objašnjava eksperimentalne ishode provedenih kemijskih reakcija te usmjerenje reakcija uz dodatak tekućina prema nastanku stabilnijeg polimorfa. Suhim mljevenjem početna forma II ne podliježe transformaciji, dok dodatkom MeOH i MeCN dolazi do nastanka smjese oba kristalna oblika. Navedeno se može obrazložiti relativno malom vrijednosti energetske razlike između polimorfa (9,6 kJ/mol) zbog čega je mogući nastanak dvofazne smjese. Računalnim modeliranjem nije ispitan utjecaj otapala na polimorfne transformacije te je to poželjno dodatno ispitati.

Povećanjem gustoće k -mreže mijenjaju se parametri jedinične ćelije te položaji atoma, a na Slici 41 navedeni su podaci koji opisuju izračunate kristalne strukture polimorfa I i II. Računalno izračunate strukture polimorfa I i II vizualizirane su pomoću programa Mercury pri čemu su korišteni i programi xcrysden i VESTA potrebni za sekundarno procesiranje datoteka.^{55,56} Zaključuje se da je zbog adekvatno odabranih pseudopotencijala kao i zadovoljavajuće postignute konvergencije rezultata, pakiranje molekula u skladu s empirijski provedenim metodama (Slika 42).

Polimorf I

CELL_PARAMETERS		
18,923651466	-0,317003177	4,806729310
-3,270539600	24,180683977	0,000000000
18,923651466	-0,317003177	-4,806729310

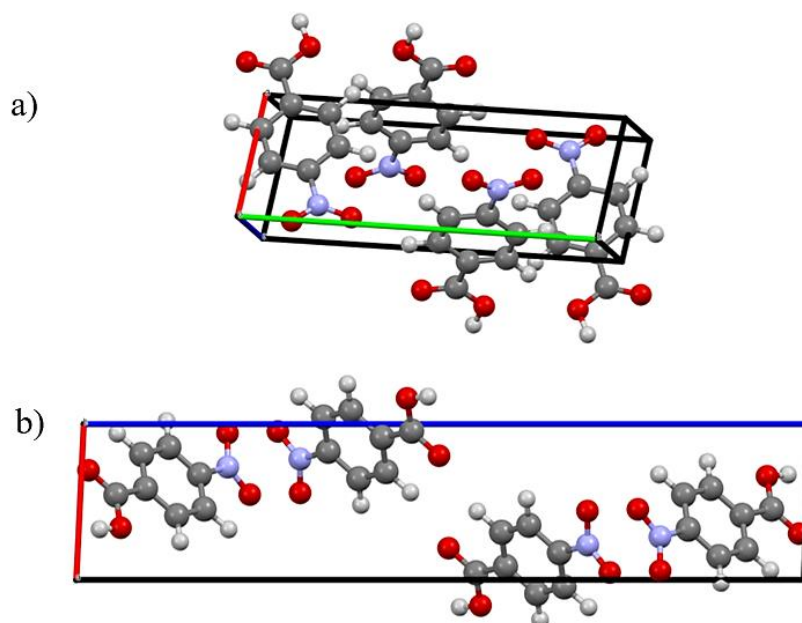
ATOMIC_POSITIONS			
O	0,624632898	0,621582502	0,348965685
O	0,651034315	0,878417498	0,375367102
O	0,375367102	0,378417498	0,651034315
O	0,348965685	0,121582502	0,624632898
N	0,383627961	0,681368765	0,195105256
N	0,804894744	0,818631235	0,616372039
N	0,616372039	0,318631235	0,804894744
N	0,195105256	0,181368765	0,383627961
C	0,904517877	0,584240715	0,917149348
C	0,082850652	0,915759285	0,095482123
C	0,095482123	0,415759285	0,082850652
C	0,917149348	0,084240715	0,904517877
H	0,495905052	0,589544414	0,526936024
H	0,473063976	0,910455586	0,504094948
H	0,504094948	0,410455586	0,473063976
H	0,526936024	0,089544414	0,495905052

Polimorf II

CELL_PARAMETERS		
9,855819709	0,000000000	0,276187000
0,000000000	9,689097531	0,000000000
-3,495680583	0,000000000	45,907821814

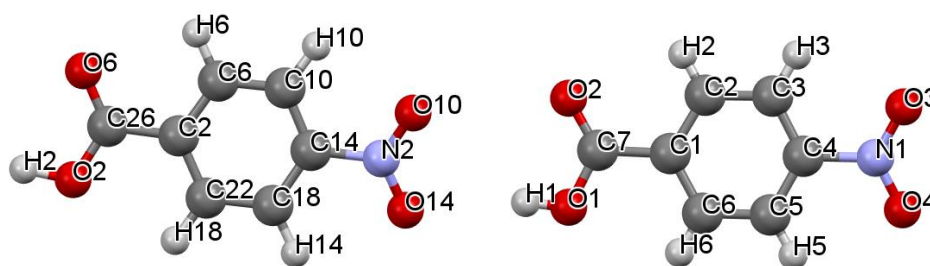
ATOMIC_POSITIONS			
C	0,413893143	0,487745375	0,089090991
C	0,086106857	0,987745375	0,410909009
C	0,586106857	0,512254625	0,910909009
C	0,913893143	0,012254625	0,589090991
N	0,275709052	0,095283617	0,200531983
N	0,224290948	0,595283617	0,299468017
N	0,724290948	0,904716383	0,799468017
N	0,775709052	0,404716383	0,700531983
O	0,664856904	0,138834796	0,057369031
O	0,835143096	0,638834796	0,442630969
O	0,335143096	0,861165204	0,942630969
O	0,164856904	0,361165204	0,557369031
H	0,675462018	-0,011846637	0,028674004
H	0,824537982	0,488153363	0,471325996
H	0,324537982	1,011846637	0,971325996
H	0,175462018	0,511846637	0,528674004

Slika 41. Parametri jediničnih ćelija i položaji atoma generirani DFT proračunima.



Slika 42. Optimirane strukture i pakiranje u jediničnoj ćeliji za:

a) polimorf I i b) polimorf II.



Slika 43. Struktura polimorfa I vizualizirana nakon provedbe DFT izračuna (lijevo) te eksperimentalno potvrđena struktura (desno) s označenim atomima.

Tablica 7. Analiza međuatomskih duljina polimorfa I eksperimentalno određene i teorijski izračunate strukture.

Broj	Polimorf I (DFT)			Polimorf I (eksp.)		
	Atom1	Atom2	Duljina veze	Atom1	Atom2	Duljina veze
1	N2	O10	1,240	N1	O3	1,226
2	N2	C14	1,464	N1	C4	1,477
3	N2	O14	1,242	N1	O4	1,224
4	O6	C26	1,250	O2	C7	1,226
5	O2	C26	1,314	O1	C7	1,313
6	O2	H2	1,041	O1	H1	0,889
7	C26	C2	1,481	C7	C1	1,490
8	C2	C22	1,402	C1	C6	1,393
9	C22	C18	1,387	C6	C5	1,387
10	C18	C14	1,391	C5	C4	1,382
11	C14	C10	1,394	C4	C3	1,384
12	C6	C10	1,386	C2	C3	1,386
13	C6	C2	1,401	C2	C1	1,394
14	C10	H10	1,087	C3	H3	0,980
15	H6	C6	1,086	C2	H2	0,960
16	C22	H18	1,088	C6	H6	0,940
17	C18	H14	1,085	C5	H5	0,950

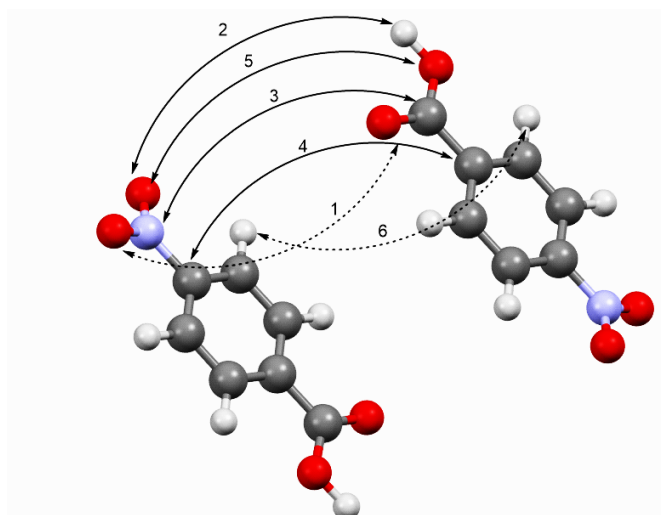
Pregledom duljina veza vidljiva je varijacija u međuatomskim udaljenostima uspoređujući eksperimentalno dobivene te računalno izračunate strukture, međutim uočava se trend većih duljina veza za generiranu strukturu kvantno-mehaničkim računom što je i u skladu s očekivanjem. Poznat je nedostatak DFT metode precjenjivanje dimenzija radi loše procjene Van der Walsovih interakcija što je ujedno i razlog odstupanja računski dobivenih podataka od eksperimentalnih. S ciljem dobivanja potpunije slike, provedena je i analiza intramolekularnih te intermolekularnih kontakata, a čiji su podaci prikazani u Tablici 8 i 9. Iz danih tablica uočava se isti trend za strukturu generiranu računalnom metodom.

Tablica 8. Analiza intramolekularnih udaljenosti eksperimentalno određene i teorijski izračunate strukture polimorfa I.

Broj	Polimorf I (DFT)			Polimorf I (eksp.)		
	Atom1	Atom2	Duljina veze	Atom1	Atom2	Duljina veze
1	O6	H2	2,378	O2	H1	2,310
2	O6	H6	2,473	O2	H2	2,510
3	H6	H10	2,491	H2	H3	2,340
4	H18	H14	2,499	H6	H5	2,330
5	H14	O14	2,437	H5	O4	2,440
6	H10	O10	2,452	H3	O3	2,460
7	O10	O14	2,193	O3	O4	2,168
8	O2	H18	2,447	O1	H6	2,460
9	O6	C2	2,324	O2	C1	2,377
10	O2	C2	2,367	O1	C1	2,359
11	O10	C14	2,318	O3	C4	2,314
12	C14	O14	2,324	C4	O4	2,320
13	C10	C18	2,445	C3	C5	2,436
14	C6	C22	2,433	C2	C6	2,421
15	C2	C14	2,749	C1	C4	2,732

Tablica 9. Analiza intermolekularnih udaljenosti eksperimentalno određene i teorijski izračunate strukture polimorfa I.

Broj	Polimorf I (DFT)			Polimorf I (eksp.)		
	Atom1	Atom2	Duljina veze	Atom1	Atom2	Duljina veze
1	O7	O13	6,750	O2	O4	6,592
2	H3	O9	7,300	H1	O3	6,210
3	C27	N1	7,090	C7	N1	6,774
4	C3	C13	7,083	C1	C4	6,780
5	O3	O9	7,470	O3	O1	6,953
6	H19	H9	7,122	H3	H6	6,820



Slika 44. Intermolekulske interakcije polimorfa I.

Zbog postojanja razlike u duljinama veza i volumeni jediničnih ćelija se razlikuju. Volumen izračunate jedinične ćelije polimorfa II iznosi $651,016 \text{ \AA}^3$ odnosno eksperimentalno dobivene $690,379 \text{ \AA}^3$. Naime, računi se izvode pri nula kelvina što je i uzrok manjih vrijednosti izračunatih volumena ćelija u odnosu na eksperimentalno dobivenu strukturu pri sobnoj temperaturi. Odstupanje računalnog modeliranja od eksperimentalnih podataka iznosi 3% pri čemu je za polimorf I, $V_{\text{rač.}} = 650,386 \text{ \AA}^3$, a $V_{\text{exp.}} = 670,220 \text{ \AA}^3$.

5. ZAKLJUČAK

- Mehanokemijska polimorfna transformacija 4-nitrobenzojeve kiseline u čvrstom stanju provedena je u vibracijskom mlinu pri čemu je u kratkom vremenskom periodu, ovisno o reakcijskim uvjetima, uočena polimorfna transformacija. Izvršene mehanokemijske reakcije ekološki su prihvatljive zbog upotrebljenih malih količina tekućih aditiva koji potiču modifikaciju polazišnog polimorfa.
- Strukturnom analizom pomoću redgenske difrakcije utvrđeno je da se u uvjetima suhog mljevenja ne događa konverzija inicijalnog polimorfa II, dok tekućinom-potpomognuto mljevenje dovodi do transformacije u smjeru nastanka polimorfa I. Ramanovom spektroskopijom *in situ* praćen je tijek reakcije te je utvrđen napredak reakcije ovisno o vrsti dodane tekućine.
- Mljevenje 4-nba u prisutnosti polarnih protičnih otapala etanola, etil-acetata, vode, teške vode i nepolarnog i aprotičnog heptana rezultiralo je pripremom polimorfa I, dok je uz polaran i protičan metanol te uz aprotičan i polaran acetonitril pripravljena smjesa polimorfa II i polimorfa I. Uočeno je kako je transformacija najbrža uz dodatak etil-acetata, a najsporija uz dodatak heptana. Uz prisutne polimorfne modifikacije, primijećena je i izotopna izmjena vodika karboksilne skupine 4-nba i deuterija tijekom mljevenja uz prisutnu tešku vodu. Dodatak tekućine olakšava difuziju usitnjenih čestica što potencijalno osigurava izmjenu izotopa, ali i aktivaciju sustava u smjeru nastanka novog polimorfa. Uporabom polarnog i aprotičnog DMF-a pripremljen je solvat (4-nba:DMF) u kojem molekula DMF-a ostvaruje vodikovu vezu s karboksilnom skupinom 4-nba.
- Kvantno-mehaničkim računima uz korištenje teorije funkcionalne gustoće predviđene su razlike u energetske stabilnosti dvaju polimorfa pri čemu je identificirana veća stabilnost polimorfa II dok mala razlika u energijama između polimorfa II i polimorfa I objašnjava pojavu smjese polimorfa u određenim uvjetima mljevenja. Računalna kemija, bez obzira na napredak računalnih programa i snage računala, može odstupati od eksperimentalnih rezultata te je stoga nužno provesti laboratorijska ispitivanja.
- Na temelju navedenog, zaključuje se da je dodatkom različitih vrsta tekućina moguće optimizirati mehanokemijske reakcije za selektivnu sintezu određenih produkata. Ispitan je učinak volumena tekućih aditiva na brzinu nastanka polimorfa I iz polimorfa II gdje je vidljivo da je osim vrste tekućine bitna i njena količina. Upravo radi većeg broja parametra koji ostvaruju svoj utjecaj, opaženo ponašanje je teško jednoznačno objasniti.

- Provedeno istraživanje pridonosi razumijevanju mehanosinteze općenito, međutim predlažu se daljnja ispitivanja kojima bi se mogle dodatno pojasniti zamijećene promjene i na taj način proširiti primjenjivost na druge sustave.

6. POPIS SIMBOLA

NG – suho mljevenje (eng. *neat grinding*)

LAG – tekućinom potpomognuto mljevenje (eng. *liquid-assisted grinding*)

ILAG – ionima i tekućinom potpomognuto mljevenje (eng. *ion and liquid-assisted grinding*)

API – aktivna farmaceutska supstanca (eng. *active pharmaceutical ingredient*)

PMMA – poli(metil-metakrilat) (eng. *polymethyl methacrylate*)

PXRD – difrakcija rendgenskog zračenja na praškastom uzorku (eng. *powder X-ray diffraction*)

CSD – kristalografska baza podataka (eng. *Cambridge Structural Database*)

CIF – kristalografska informacijska datoteka (eng. *crystallographic information file*)

ZPE – energija nulte točke (eng. *zero-point energy*)

DFT – teorija funkcionala gustoće (eng. *density functional theory*)

GGA – aproksimacija poopćenog gradijenta (eng. *generalised gradient approximation*)

7. LITERATURA

- [1] R. B. N. Baig, R. S. Varma *Chem., Soc. Rev.* **41** (2012) 1559-1584.
- [2] E. Colacino, G. Dayaker, A. Morère, T. Friščić, Introducing Students to Mechanochemistry via Environmentally Friendly Organic Synthesis Using a Solvent-Free Mechanochemical Preparation of the Antidiabetic Drug Tolbutamide, *Journal of Chemical Education* **96** (2019) 766-771.
- [3] <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Austedo#section=Structures> (pristup:10.07.2020.)
- [4] K. J. Ardilla-Fierro, J. G. Hernández, *Sustainability Assessment of Mechanochemistry by Using the Twelve Principles of Green Chemistry* (2021).
- [5] D. Tan, F. García, Main group mechanochemistry: from curiosity to established protocols, *Chemical Science Reviews*, **48 (8)** (2019) 2274-2292.
- [6] G. Kaupp, Mechanochemistry: the varied applications of mechanical bond-breaking, *CrystEngComm*, **11(3)** (2019) 388–403.
- [7] D. Tan, L. Loots, T. Friščić, Towards medicinal mechanochemistry: evolution of milling from pharmaceutical solid form screening to the synthesis of active pharmaceutical ingredients (APIs), *Chemical Communications*, **52(50)** (2016) 7760–7781.
- [8] J. L. Howard, Q. Cao, D. L. Browne, Mechanochemistry as an emerging tool for molecular synthesis: what can it offer?, *Chemical Science Reviews*, **9(12)** (2018) 3080–3094.
- [9] J. Andersen, J. Mack, Mechanochemistry and organic synthesis: from mystical to practical, *Green Chemistry*, **20(7)** (2018) 1435–1443.
- [10] D. E. Crawford, C. K. G. Miskimmin, A. B. Albadarin, G. Walker, S. L. James, Organic synthesis by Twin Screw Extrusion (TSE): continuous, scalable and solvent-free, *Green Chemistry*, **19(6)** (2017) 1507–1518.
- [11] <http://www.polymerprocessing.com/operations/tscrew> (pristup 21.07.2020.)
- [12] C. Xu, S. De, A. M. Balu, M. Ojedad, R. Luque, Mechanochemical synthesis of advanced nanomaterials for catalytic applications, *Chem. Commun.*, **51** (2015) 6698-6713.
- [13] W. Jones, M. D. Eddleston, Introductory Lecture: Mechanochemistry, a versatile synthesis strategy for new materials, *Faraday Discuss.*, **170** (2014) 9–34.
- [14] E. Boldyreva, Mechanochemistry of inorganic and organic systems: what is similar, what is different? *Chemical Society Reviews*, **42(18)** (2013) 7719.

- [15] K. Mužina, I. Minga, V. Mandić, S. Kurajica, Uvod u nanotehnologiju, materijali za vježbe, Zavod za anorgansku kemijsku tehnologiju i nemetale FKIT, Zagreb 2018.
- [16] M. Ladd, P. Rex, Structure Determination by X-ray Crystallography: Analysis by X-rays and Neutrons 5th Edition (2013) 784.
- [17] B. D. Cullity, S. R. Stock, Elements of X-Ray Diffraction (2001).
- [18] <https://www.stresstech.com/stresstech-bulletin-12-measurement-methods-of-residual-stresses/> (pristup 16.08.2020.)
- [19] B. B. He, Two-dimensional X-ray Diffraction (2018).
- [20] A. M. Belenguer, A. J. Cruz-Cabeza, G. I. Lampronti and J. K. M. Sanders, *CrystEngComm*, **21** (2019) 2203-2211.
- [21] Y. Washeda, E. Matsubara, K. Shinoda, X-Ray Diffraction Crystallography: Introduction, Examples and Solved Problems, Springer (2011).
- [22] <https://www.doitpoms.ac.uk/tlplib/crystallography3/parameters.php> (pristup 16.08.2020.)
- [23] W. Borchardt-Ott, Crystallography, Springer, Berlin (1995).
- [24] R. J. Hill, Rietveld refinement round robin. I. Analysis of standard X-ray and neutron data for PbSO₄, *Journal of Applied Crystallography*, **25(5)** (1992) 589–610.
- [25] S. Musić, N. Filipović-Vinceković, L. Sekovanić, Precipitation of amorphous SiO₂ particles and their properties, *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, **28(1)** (2011) 89–94.
- [26] A. R. West, Solid State Chemistry and its Applications, 2nd Edition, (2014) 582.
- [27] P. A. Julien, I. Malvestiti, T. Friščić, The effect of milling frequency on a mechanochemical organic reaction monitored by in situ Raman spectroscopy, *Beilstein Journal of Organic Chemistry*, **13** (2017) 2160–2168.
- [28] T. Stolar, S. Lukin, M. Tireli, I. Sović, B. Karadeniz, I. Kereković, K. Užarević, Control of pharmaceutical cocrystal polymorphism on various scales by mechanochemistry: transfer from the laboratory batch to the large-scale extrusion processing, *ACS Sustainable Chemistry & Engineering* **7(7)** (2019) 7102-7710.
- [29] D. Braga, F. Grepioni, L. Maini, The growing world of crystal forms, *Chemical Communications*, **46(34)** (2010) 6232.

- [30] T. Shakhshneider, Phase transformations and stabilization of metastable states of molecular crystals under mechanical activation., *Solid State Ionics*, (1997) 851–856.
- [31] D. Braga, F. Grepioni, Making crystals from crystals: a green route to crystal engineering and polymorphism., *Chemical Communications*, **29** (2005) 3635.
- [32] L. Croitor, M. F. Szerb, G. Vlase, P. Bouroush, Y. Chumakov, M. Crisan, Role of 4-nitrobenzoic acid polymorphs in the crystallization process of the organic acid-base multicomponent system, *CrystEngComm*. (2019).
- [33] S. G. Dash, S. S. Singh, T. S. Thakur, Structural landscape guided exploration of a new polymorph of 4-nitrobenzoic acid, *Crystal Growth & Design*. (2019).
- [34] K. Rosman, P. Taylor, Isotopic compositions of the elements, *Pure Appl Chem.*, **70** (1998) 217–235.
- [35] N. A. Meanwell, *Synopsis of Some Recent Tactical Application of Bioisosteres in Drug Design*, *Journal of Medicinal Chemistry*, **54**(8) (2011) 2529–2591.
- [36] T. Pirali, M. Serafini, S. Cargnin, A. A. Genazzani, Applications of deuterium in medicinal chemistry, *Journal of Medicinal Chemistry* (2019).
- [37] J. Gao, Enzymatic Kinetic Isotope Effects from Path-Integral Free Energy Perturbation Theory, *Computational Approaches for Studying Enzyme Mechanism Part A*, (2016) 359–388.
- [38] S. Harbeson, R. Tung, Deuterium Medicinal Chemistry: A New Approach to Drug Discovery and Development., *Med Chem News*, **24** (2014) 8–22.
- [39] [https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Physical_and_Theoretical_Chemistry_Textbook_Maps/Supplemental_Modules_\(Physical_and_Theoretical_Chemistry\)/Quantum_Mechanics/06._One_Dimensional_Harmonic_Oscillator/Kinetic_Isotope_Effects](https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Physical_and_Theoretical_Chemistry_Textbook_Maps/Supplemental_Modules_(Physical_and_Theoretical_Chemistry)/Quantum_Mechanics/06._One_Dimensional_Harmonic_Oscillator/Kinetic_Isotope_Effects) (pristup: 03.09.2020.)
- [40] H. Vujić, B. Zorc, Z. Rajić, Lijekovi u terapiji parkinsonove bolesti, Farmaceutsko-biokemijski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb (2010).
- [41] S. Lukin, M. Tireli, T. Stolar, D. Barišić, M. V. Blanco, M. Di Michiel, I. Halasz, Isotope Labeling Reveals Fast Atomic and Molecular Exchange in Mechanochemical Milling Reactions., *Journal of the American Chemical Society*, **141** (3) (2019) 1212-1216.
- [42] H. Mujagić, B. A. Chabner, Z. Mujagić, Mechanism of action and potential therapeutic uses of thalidomide, *Croatian medical journal.*, **43** (2002) 274-285.

- [43] F. Jensen, Introduction to Computational Chemistry, Second Edition, *Chichester* (2007) 16-20.
- [44] D. C. Young, Introduction In Computational Chemistry, *John Wiley and Sons* (2001) 1-4.
- [45] S. Cottenier, Density functional theory and family of (L)APW-methods: a step by step introduction 2nd edition, *Wiley* (2013).
- [46] D. S. Sholl, J. A. Steckel, Density functional theory: A practical introduction (2009).
- [47] H. J. Monkhorst, J. D. Pack, Special points for Brillouin-zone integrations, *Physical Review B*. **13** (1976) 5188–5192.
- [48] G. M. Rignanese, P. Ghosez, J. C. Charlier, J. P. Michenaud, X. Gonze, Scaling hypothesis for corrections to total energy and stress in plane-wave-based ab initio calculations, *Physical Review B*. **52(11)** (1995) 8160–8178.
- [49] M. Fuchs, M. Scheffler, Ab initio pseudopotentials for electronic structure calculations of poly-atomic systems using density-functional theory, *Computer Physics Communications* **119(1)** (1999) 67–98.
- [50] W. Koch, M. C. Holthausen, A Chemist's Guide to Density Functional Theory, Second Edition, *Wiley* (2001).
- [51] J. Anwar, D. Zahn, Polymorphic Phase Transitions: Macroscopic Theory and Molecular Simulation, *Advanced Drug Delivery Review* (2017).
- [52] J. Paier, R. Hirschl, M. Marsman, G. Kresse, The Perdew–Burke–Ernzerhof exchange–correlation functional applied to the G2-1 test set using a plane-wave basis set, *The Journal of Chemical Physics*, **122(23)** (2005) 234102.
- [53] https://www.quantum-espresso.org/Doc/INPUT_PW.html (datum pristupanja: 07.06.2021.)
- [54] <https://www.chemie.uni-bonn.de/pctc/mulliken-center/software/dft-d3/> (datum pristupanja: 07.06.2021.)
- [55] <http://www.xcrysden.org/doc/pwscf.html> (datum pristupanja: 07.06.2021.)
- [56] <https://jp-minerals.org/vesta/en/> (datum pristupanja: 07.06.2021.)