

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO



TJAŠA MATJAŠEC

**VREDNOTENJE MEHANSKIH LASTNOSTI RAZLIČNIH POLIMORFNIH
OBLIK KLORPROPAMIDA Z INSTRUMENTALNO NANOINDENTACIJO**

**EVALUATION OF MECHANICAL PROPERTIES OF DIFFERENT
POLYMORPHIC FORMS OF CHLORPROPAMIDE
BY INSTRUMENTAL NANOINDENTATION**

MAGISTRSKO DELO

Ljubljana, 2015

Magistrsko naložko sem opravljala na Katedri za farmacevtsko tehnologijo Fakultete za farmacijo pod mentorstvom prof. dr. Stanka Srčiča, mag. farm. in somentorstvom doc. dr. Biljane Janković, mag. farm. Meritve z instrumentalno nanoindentacijo smo opravili na Naravoslovnotehniški fakulteti, Oddelek za materiale in metalurgijo.

ZAHVALA

Zahvaljujem se mentorju, prof. dr. Stanku Srčiču, mag. farm., za nasvete in strokovno pomoč pri izdelavi magistrske naloge. Prav tako se iskreno zahvaljujem somentorici doc. dr. Biljani Janković, mag. farm. za posredovanje strokovnega znanja in pomoč pri pisanju magistrske naloge. Zahvaljujem se tudi asist. dr. Mateji Egart, mag. farm. za pomoč pri eksperimentalnem delu.

Posebna zahvala in neizmerna hvaležnost je namenjena mojim staršem, sestrama Luciji in Urši, fantu Janu ter preostalim družinskim članom, ki so verjeli vame in mi nudili podporo v času celotnega študija.

Izjava

Izjavljam, da sem magistrsko naložko samostojno izdelala pod mentorstvom prof. dr. Stanka Srčiča, mag. farm. in somentorstvom doc. dr. Biljane Janković, mag. farm.

Tjaša Matjašec

Predsednica komisije: prof. dr. Janja Marc, mag. farm., spec. med. biokem.

Član komisije: asist. dr. Rok Frlan, mag. farm.

KAZALO VSEBINE

POVZETEK	I
ABSTRACT	II
SEZNAM OKRAJŠAV	III
1 UVOD	1
1.1 TRDNE SNOVI	1
1.1.1 Struktura kristalov	1
1.1.2 Nastanek kristalov	4
1.1.3 Polimorfizem	6
1.1.4 Mehanske lastnosti	7
1.1.5 Mehanizem plastične deformacije kristalov	9
1.2 NANOINDENTACIJA.....	10
1.2.1 Tehnika nanoindentacije.....	10
1.2.2 Tehnika kontinuiranega merjenja togosti	12
1.3 KLORPROPAMID.....	15
1.3.1 Polimorfi klorpropamida	15
NAMEN DELA	16
3 MATERIALI IN METODE	17
3.1 MATERIALI	17
3.1.1 Farmakološko aktivne snovi	17
3.1.2 Način priprave polimornih oblik	20
3.1.3 Laboratorijska oprema.....	21
3.2 METODE	22
3.2.1 Diferenčna dinamična kalorimetrija (DSC).....	22
3.2.2 Instrumentalna nanoindentacija	23
4 EKSPERIMENTALNO DELO	25
4.1 DIFERENČNA DINAMIČNA KALORIMETRIJA (DSC)	25
4.2 INSTRUMENTALNA NANOINDENTACIJA	26
5 REZULTATI IN RAZPRAVA.....	28
5.1 DIFERENČNA DINAMIČNA KALORIMETRIJA (DSC)	28
5.2 VPLIV KONFORMACIJSKEGA POLIMORFIZMA NA NAČIN DEFORMACIJE KRISTALOV KLORPROPAMIDA	32

5.2.1 Vrednotenje mehanskih lastnosti polimorfnih oblik klorpropamida z instrumentalno nanoindentacijo	32
5.2.2 Povezava mehanskih lastnosti polimorfnih oblik klorpropamida z njihovo strukturo	35
5.2.3 Primerjava mehanskih lastnosti polimorfnih oblik klorpropamida z drugimi zdravilnimi učinkovinami	42
6 SKLEP	45
7 LITERATURA	47

POVZETEK

Zdravilne učinkovine se največkrat nahajajo v trdnem agregatnem stanju. Večinoma so to majhne organske molekule v obliki kristalov. Določene zdravilne učinkovine se lahko pojavljajo v različnih kristalnih strukturah tako imenovanih polimorfnih oblikah. Namen magistrske naloge je bil ugotoviti in pojasniti ali ima polimorfizem klorpropamida vpliv na njegove mehanske lastnosti in oceniti katera polimorfna oblika ima najprimernejše mehanske lastnosti za proces tabletiranja.

V okviru eksperimentalnega dela naloge smo vrednotili mehanske lastnosti štirim polimorfnim oblikam klorpropamida: α , β , γ in δ . Metoda, ki nam je omogočila določitev mehanskih parametrov na nivoju posameznih orientiranih kristalov je bila instrumentalna nanoindentacija. Metoda je nedestruktivna in zahteva le minimalno količino vzorca, kar je še posebej prednost pri predformulacijskih raziskavah. Princip merjenja temelji na vtiskovanju konice indenterja v preiskovani material in beleženjem deformacije v odvisnosti od sile. Uporabili smo tehniko kontinuiranega merjenja togosti (ang. Continuous stiffness measurement - CSM), ki je izboljšava klasične tehnike, saj nam omogoča merjenje mehanskih lastnosti (*Young-ov modul, vtisna trdnost*) kot funkcijo globine vtisa.

Mehansko obnašanje klorpropamida smo vrednotili s pomočjo *Young-ovega modula* (pokazatelj elastičnosti snovi), *vtisne trdnosti* (pokazatelj plastičnosti snovi) in *meje plastičnosti*, mejnega tlaka pri katerem nastopi plastična deformacija materiala. Za opis deformacijskih lastnosti materialov smo uporabili razmerji *Young-ov modul/meja plastičnosti* in *vtisna trdnost/meja plastičnosti*. Plastičnost polimorfnih oblik narašča v naslednjem vrstnem redu: klorpropamid β , klorpropamid γ , klorpropamid δ , klorpropamid α . Vrednosti izmerjenih mehanskih lastnosti klorpropamidov smo primerjali z mehanskimi parametri drugih zdravilnih učinkov (piroksikam I, famotidin A, famotidin B, nifedipin α in olanzapin I). Na podlagi primerjave smo ugotovili, da so polimorfi klorpropamida bolj plastični od primerjalnih zdravilnih učinkov, kar je primerna lastnost za tabletiranje.

Mehanske lastnosti polimorfnih oblik klorpropamida smo razložili z opisom njihove strukture. Večjo plastičnost smo povezali z vtiskovanjem v smeri drsne ravnine (ozioroma v smeri vodikovih vezi) za katero je značilna najnižja interakcijska energija. V primeru deformacije »zig-zag« strukture, za katero je značilna gostejša ureditev kristalnih ravnin, je bila togost (*Young-ov modul*) kristalne oblike pri nanoindentaciji bolj izražena.

Zaključili smo, da polimorfizem klorpropamida vpliva na njihove mehanske lastnosti, saj se vrednosti meritev med polimorfnimi oblikami razlikujejo. Klorpropamid α je zaradi najvišje vrednosti razmerij *vtisna trdnost/meja plastičnosti* in *Young-ov modul/meja plastičnosti* najbolj primerna oblika za tabletiranje.

ABSTRACT

Active ingredients are usually in the solid physical state. Most of them are small organic molecules in the form of crystals. Some of them may occur in different crystal structures in the so-called polymorphic forms. The aim of this work was to identify and clarify whether chlorpropamide polymorphism has any influence whatsoever on its mechanical properties and to evaluate which of the polymorphic forms has the most suitable mechanical characteristics for the process of tabletting.

Within our research work the mechanical properties of four polymorphic forms of chlorpropamide: α , β , γ in δ have been evaluated. The method which allowed us to determine the mechanical parameters at the level of individual crystals was instrumental nanoindentation. This method is non-destructive and needs minimal amount of specimen, which is desirable in the preformulation phase. The measuring principle is based on controlled compression of sample with sharp tip and controlled decompression of the same, while we are monitoring the dependence of deformation vs. force. In the current study, continuous stiffness measurement was applied, which provides determination of mechanical parameters (*Young's modulus* and *indentation hardness*) as a function of indentation depth.

The following mechanical parameters were determined: *Young's modulus* (indicator of elasticity), *indentation hardness* and *yield stress* (indicators of plasticity). To predict the behaviour of the materials during deformation, ratio of *Young's modulus/yield stress* and ratio of *hardness/yield stress* were applied. The rank of plasticity was ranged in the following order: chlorpropamide β , chlorpropamide γ , chlorpropamide δ , chlorpropamide α . Eventually, measured values of mechanical properties for polymorphs of chlorpropamide were compared to deformational behaviour of selected active substances: piroxicam I, famotidine A, famotidine B, nifedipine α and olanzapine I. Polymorphs of chlorpropamide have lower levels of mechanical parameters which means that they are more plastic than compared active ingredients; therefore, they are quite suitable for tabletting.

The mechanical properties of polymorphic forms of chlorpropamide were explained with the description of their structures. Greater plasticity was connected with a compression in the direction of the slip planes (direction of the hydrogen bonds) which is characterized by the lowest interaction energy. In the case of deformation of the »zig-zag« structure, which is characterized by a more dense arrangement of crystal planes, the stiffness (*Young's modulus*) during nanoindentation was more expressed.

We concluded that polymorphism of chlorpropamide has an affect on their mechanical properties as the measured values between the polymorphic forms differ. Moreover, chlorpropamide α has the highest value of ratios *Young's modulus/yield stress*

and *hardness/yield stress* which means, that it shows the largest proportion of plastic deformation during loading and is therefore the most suitable for tabletting.

Ključne besede

Polimorfizem, nanoindentacija, mehanske lastnosti, klorpropamid.

Keywords

Polymorphism, nanoindentation, mechanical properties, chlorpropamide.

SEZNAM OKRAJŠAV

E *Young-ov modul*

H *vtisna trdnost*

S *togost*

P_y *meja plastičnosti*

T_r *temperatura polimorfnega prehoda*

CSM *tehnika kontinuiranega merjenja togosti*

DSC *diferenčna dinamična kalorimetrija*

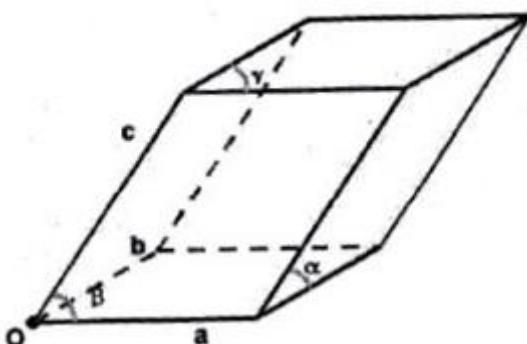
1 UVOD

1.1 TRDNE SNOVI

Zdravilne učinkovine so najpogosteje v trdnem agregatnem stanju. Trdno snov sestavljajo osnovni gradniki - atomi, molekule ali ioni. Glede na urejenost osnovnih gradnikov delimo trdne snovi na amorfne in kristale. Za kristale je značilna urejenost osnovnih gradnikov na daljših razdaljah. Urejeni so v ponavljajočem tridimenzionalnem vzorcu. Nasprotno pa za amorfne snovi daljnosežna urejenost osnovnih gradnikov ne obstaja. Pri amorfnih snoveh je urejenost prisotna le na kratkih razdaljah (1).

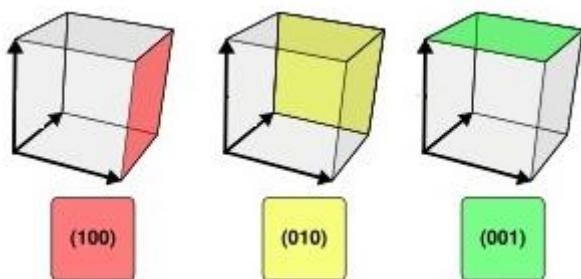
1.1.1 Struktura kristalov

Za kristalno snov je značilno, da so gradniki lahko v prostoru različno razporejeni in tako tvorijo različne kristalne strukture oz. kristalne mreže. Za lažji opis kristalne strukture imenujemo ponavljajočo se enoto osnovna celica (slika 1).



Slika 1: Elementi osnovne celice kristala: a, b, c: dimenzijsi robov osnovne celice, α , β , γ : koti med robovi osnovne celice (2)

Ploskve osnovnih celic so povezane v kristalografske ploskve oziroma ravnine. Za lažji opis strukture kristala so ploskve osnovnih celic označene s t.i. Millerjevimi indeksi. Zapisujejo se v okroglih oklepajih in označujejo na koliko delov kristalografska ravnina razdeli robove osnovne celice. Ko ravnina ne seka osi ima indeks vrednost 0 (3).



Slika 2: Primer zapisa ploskev celice s pomočjo Millerjevih indeksov; 100: ravnina, ki je pravokotna na smer a, 010: ravnina, ki je pravokotna na smer b, 001: ravnina, ki je pravokotna na smer c (4)

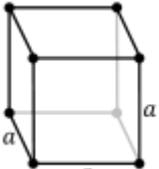
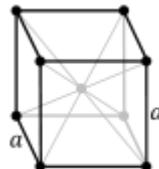
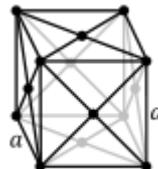
Oblike osnovnih celic lahko razdelimo v 7 osnovnih oblik, glede na dolžino robov in velikost kotov med njimi. Francoski kristalograf Bravais je poleg osnovne oblike celice, upošteval še principe simetrije, ter konstruiral 14 kristalnih mrež (preglednica I). Glede na postavitev gradnikov znotraj osnovne celice ločimo njihove štiri tipe:

- Gradniki lahko ležijo samo v ogliščih osnovne celice. Tako postavitev imenujemo primitivna celica (ang. *Primitive unit cell*).
- Osnovne celice, kjer se dodaten gradnik nahaja v središču celice imenujemo telesno centrirana celica (ang. *body-centred unit cell*).
- Pri vseploskovno centrirani celici (ang. *all-face-centred unit cell*) se dodatni gradniki nahajajo v središčih vseh ploskev celice.
- Ploskovno centrirana celica (ang. *one-face-centred unit cell*) je tista, kjer se dodatna gradnika nahajata na dveh nasprotnih si ploskvah (2, 3).

Preglednica I: Kristalni sistemi s Bravaisovimi mrežami (2)

7 kristalnih sistemov	14 Bravaisovih (prostorskih) mrež
<i>Triklinski</i>	primitivna $\alpha, \beta, \gamma \neq 90^\circ$

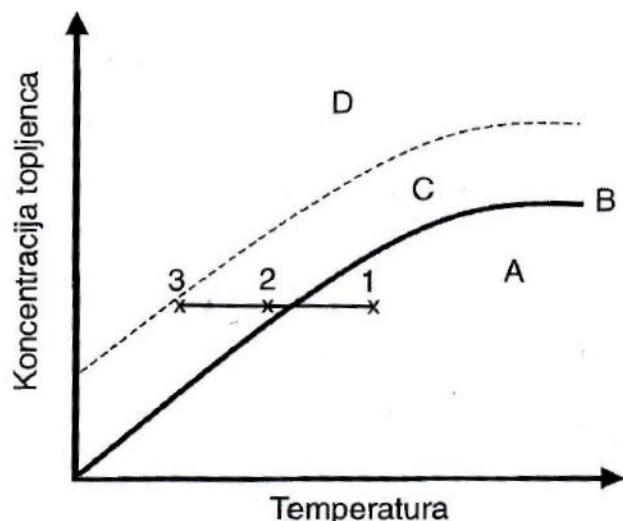
<i>Monoklinski</i>	primitivna $\alpha \neq 90^\circ$ $\beta, \gamma = 90^\circ$ 	ploskovno centrirana $\alpha \neq 90^\circ$ $\beta, \gamma = 90^\circ$ 		
<i>Ortorombski</i>	primitivna $a \neq b \neq c$ 	ploskovno centrirana $a \neq b \neq c$ 	telesno centrirana $a \neq b \neq c$ 	vseploskovno centrirana $a \neq b \neq c$
<i>Trigonalni romboedrični</i>	primitivna $\alpha=\beta=\gamma \neq 90^\circ$ 			
<i>Tetragonalni</i>	primitivna $a \neq c$ 	telesno centrirana $a \neq c$ 		

<i>Heksagonalni</i>			
	primitivna		
<i>Kubični</i>	primitivna	telesno centrirana	ploskovno centrirana
			

1.1.2 Nastanek kristalov

Kristalna snov nastane v procesu kristalizacije – tvorba kristalov iz taline, iz plinaste faze, iz superkritičnega fluida ali iz prenasičene raztopine. Proses kristalizacije poteka preko nastanka jeder ozziroma nukleacije in rastjo kristalov (5).

Prične se z združevanjem majhnega števila molekul. Dokler ne dosežejo določenega (kritičnega) polmera so ti skupki nestabilni in razpadajo. Ob dovolj prenasičeni tekočini, plinu ali talini postanejo stabilni. Da postane sistem prenasičen moramo preseči topnost snovi. To lahko dosežemo s povečevanjem koncentracije topljenca (npr. odparevanje topila) ali z znižanjem topnosti topljenca (npr. spremembra temperature, dodatek netopila, spremembra pH) (5). Pogoje prenasičenja najlažje opišemo s topnostnim diagramom (slika 3).



Slika 3: Primer topnognega diagrama za kristalizacijo spojine (2)

Krivilja B na sliki 3 predstavlja mejo nasičenja spojine v topilu. V področju A je sistem v nenasičenem stanju, zato kristalizacija v točki 1 ne poteka. Če sistem v točki 1 ohlajamo, postane v točki 2 nasičen. Ob nadalnjem ohlajanju preidemo v vedno bolj prenasičen sistem. V točki 3 sistem doseže območje D, kjer je prenasičenje dovolj veliko, da lahko prihaja do spontane agregacije molekul v raztopini, kar vodi v nastanek jeder in rast kristalov. V območju C (imenovano metastabilno območje) je sistem manj prenasičen, zato poteka le rast kristalov, saj je nastanek jeder energijsko zahtevnejši od rasti kristalov (1).

Rast kristalov poteka preko nalaganja snovi na zunanjou ploskev kristala ter vgrajevanja snovi v kristalno rešetko. Različne ploskve kristala rastejo z različno hitrostjo, kar vpliva na končno obliko kristala. Na hitrost rasti vpliva prenasičenje, temperatura, dodatki in hidrodinamični pogoji. Področja na kristalu, ki so sposobna uloviti molekule in jo vgraditi v kristalno ploskev imenujemo zanka (1). Obstaja več mehanizmov rasti kristala:

- Nepretrgana rast: Kristalizacija iz raztopin poteka po tem mehanizmu, kadar površina vsebuje veliko zank. Molekule se ujamejo v kristal tako, da tvorijo obliko stopnic. Po tem mehanizmu rasti imajo kristali hrapavo površino. Značilen je zaobarjanje iz plinske faze in talin (6).
- Površinska ali dvodimensionalna rast: Molekule se ujamejo na površino tako, da tvorijo otok. Okoli otoka se ulovijo nove molekule. Otok tako raste po površini kristala, dokler se cela površina ne prekrije z monomolekularno plastjo (1).

- Spiralna rast: Spiralna rast nastane pri kristalih kjer je ena regija kristala v obliki zavite deformacije dvignjena nad drugo. Površina kristala, ki predstavlja debelino ene molekule ima, podobno kot zanka, energetsko ugoden položaj za nadaljnje nalaganje. Rast po tem mehanizmu poteka v obliki spirale (1).

1.1.3 Polimorfizem

Polimorfizem (gr. *poly* – mnogo, *morphe* – oblika) je sposobnost obstoja elementov ali molekul v vsaj dveh različnih prostorskih ureditvah v trdnem stanju, ki se značilno razlikujeta v fizikalnih lastnostih (7). Strukturne značilnosti polimorfizma so posledica dveh mehanizmov:

- strukturni polimorfizem (ang. *packing polymorphism*) - mehanizem, kjer se relativno rigidne molekule urejajo v različne kristalne strukture.
- konformacijski polimorfizem (ang. *conformational polymorphism*) – fleksibilne (gibljive) molekule se urejajo v različne konformere, ki se urejajo v različne kristalne strukture (8).

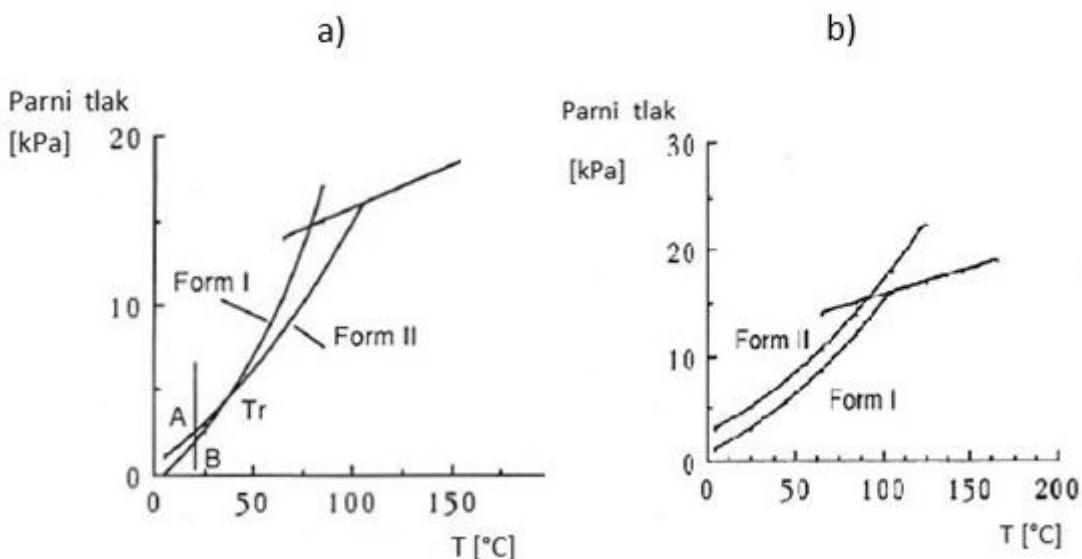
Strukturno ureditev, ki poleg istovrstnih molekul vsebuje tudi vezane tudi molekule topila (solvati) imenujemo psevdopolimorfizem. Polimorfne oblike iste snovi imajo lahko različne mehanske in fizikalno-kemijske lastnosti - temperatura tališča, topnost, stabilnost, hitrost raztopljanja, intrinzična topnost, biološko uporabnost, obliko delcev, gostoto, barvo in stisljivost (9).

Pod določenimi pogoji je lahko najbolj stabilna le ena polimorfna oblika. Polimorfne oblike, ki so pod temi pogoji manj stabilne, imenujemo metastabilni polimorfi. Poznamo dva tipa polimorfizma;

- enantiotropni in
- monotropni polimorfizem.

Za monotropni polimorfizem je značilno da je pri katerikoli temperaturi, nižji od temperature tališč obeh polimorfnih oblik, stabilna vedno ista polimorfna oblika. Pri enantiotropnem polimorfizmu obstaja temperatura polimorfnegra prehoda (ang. *transition temperature* - T_r), pod katero je stabilna ena polimorfna oblika, nad njo pa druga (7).

Sistema lahko dobro opišemo z grafom na sliki 4. Pri enantiotropnem sistemu ima oblika I pod temperaturo T_r nižji parni tlak in je zato stabilnejša. Pri pretvorbi snovi iz točke A (polimorfna oblika II) v točko B (polimorfna oblika I) se sistemu zmanjša energija (proses poteka spontano). Oblika II je torej metastabilna oblika. Pri monotropnem sistemu je polimorfna oblika II metastabilna tekom celega procesa taljenja (7).



Slika 4: Odvisnost parnega tlaka od temperature v a) monotropnem sistemu in b) enantiotropnem sistemu (7)

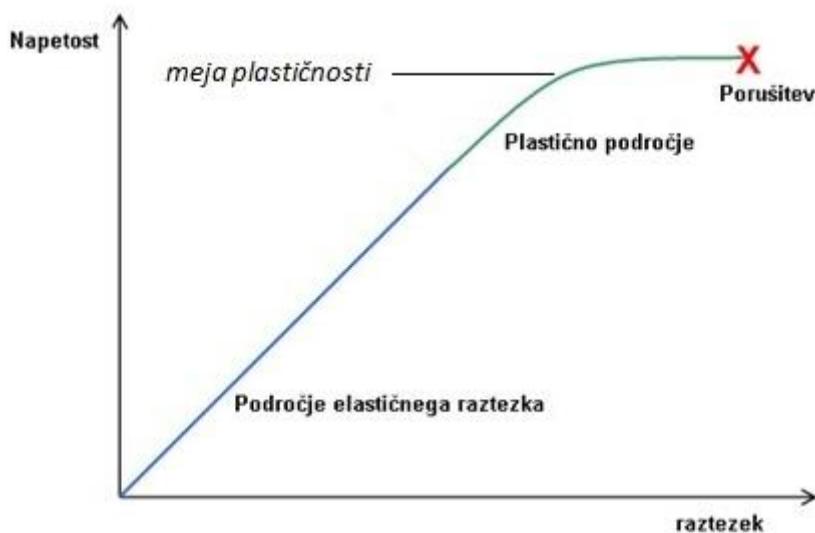
1.1.4 Mehanske lastnosti

Lastnosti trdnih snovi opisujemo kot fizikalne, kemijske in mehanske. Mehanske lastnosti so tiste, ki določajo, kako se snov deformira, ko je izpostavljena mehanski obremenitvi (10). Pri obremenitvi se snov najprej deformira elastično oziroma prožno. Elastična deformacija narašča linearno s povečanjem obremenitve. Delci se po prenehanju obremenitve povrnejo v svojo prvotno obliko. V tem območju velja *Hook-ov* zakon (enačba I) (11).

$$\frac{F}{S} = E \frac{\Delta l}{l} \quad \text{Enačba I}$$

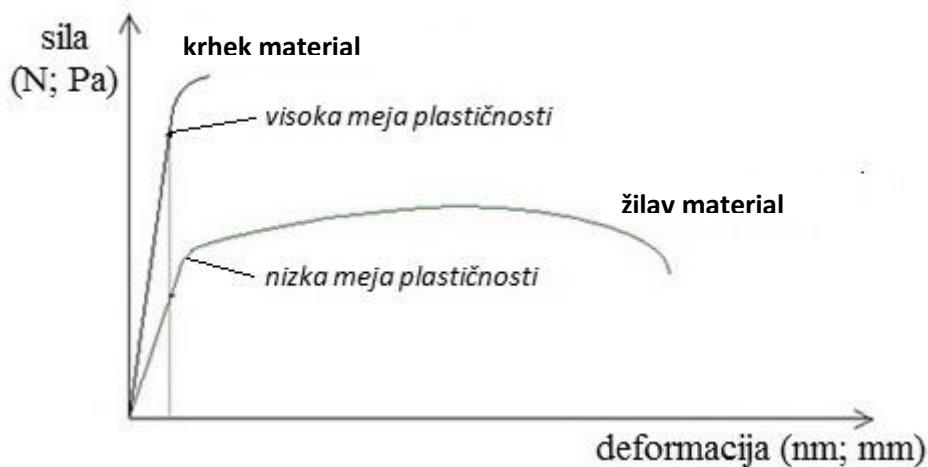
$\frac{\Delta l}{l}$ predstavlja relativni raztezek ali skrček materiala pri deformaciji pri tlaku obremenjevanja ($\frac{F}{S}$). Sorazmernostni faktor imenujemo *elastični* ali *Young-ov modul* (E), ki je intrinzična (intenzivna) lastnost materiala. Snov z visokim *Young-ovim* modulom izraža majhno elastičnost in obratno (11). Npr. kavčuk ima nizko vrednost modula E , diamant pa zelo visokega.

Na sliki 5 področje veljave *Hook-ovega* zakona predstavlja del krivulje, ki jeobarvan modro (področje elastičnega raztezka). Ob povečevanju obremenitve na snov dosežemo *mejo plastičnosti* P_y (ang. *yield stress*). Takrat je obremenitev večja od intermolekularnih sil v delcu. V tej točki prenega elastična deformacija in nastopi plastična deformacija, ki je ireverzibilna (slika 5).



Slika 5: Krivulja napetost/deformacija (12)

Odpornost materiala proti plastični deformaciji predstavlja trdnost (H). Mehanizem deformacije je po doseganju P_y lahko različen in najpogosteje predstavlja kombinacijo plastične deformacije in fragmentacije. Materiali z nizkim P_y in značilno površino pod krivuljo so žilavi. Po drugi strani krhki materiali, po doseganju P_y , izkazujejo tendenco k lomljjenju in imajo minimalno površino pod krivuljo *obremenitev/deformacija* (slika 6) (11).

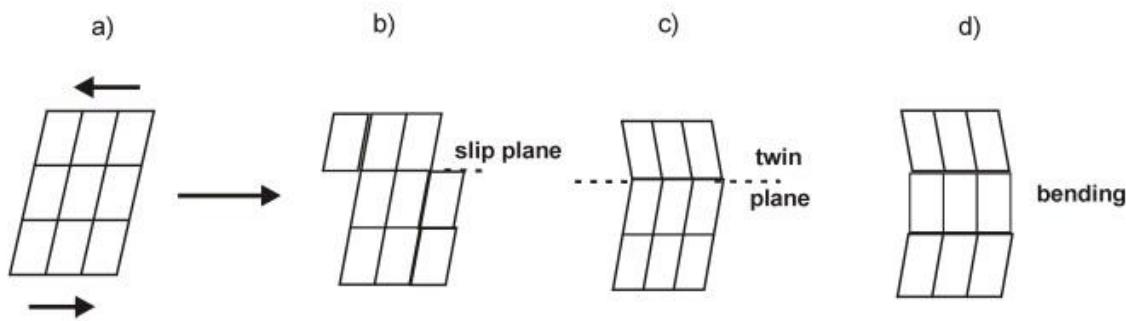


Slika 6: Meja plastičnosti pri krhkih in žilavih materialih (13)

1.1.5 Mehanizem plastične deformacije kristalov

Glede na strukturo materiala se ti lahko deformirajo preko različnih mehanizmov plastične deformacije:

- Zdrs (ang. *slip*) je značilen za kristale, ki so urejeni v plasteh. Ob izpostavljeni obremenitvi kristala ena plast kristala zdrsne ob drugo ter tako povzroči ireverzibilno deformacijo. Zdrs poteče na specifični ravnini kristala, imenovani drsna ravnina (ang. *slip planes*). Drsna ravnina je kristalografska ravnina, ki ima najnižjo interakcijsko energijo. Usmerjenost kristalografskih ravnin ostane po končani obremenitvi nespremenjena.
- Ob dvojčenju (ang. *twinning*) se kristalna rešetka deformira tako, da so si zaporedne ravnine kristalne rešetke med seboj zrcalne, kot je shematsko prikazano na sliki 7.
- Spojine z neurejeno strukturo so ob povečani obremenitvi izpostavljeni upogibanju (ang. »*bending*«) - kristal se pod obremenitvijo upogne, ne da bi se zlomil. Upogibanje je značilno za kristale, kjer interakcije niso enotne in enakomerne v vseh smereh (anizotropni kristali) (14).



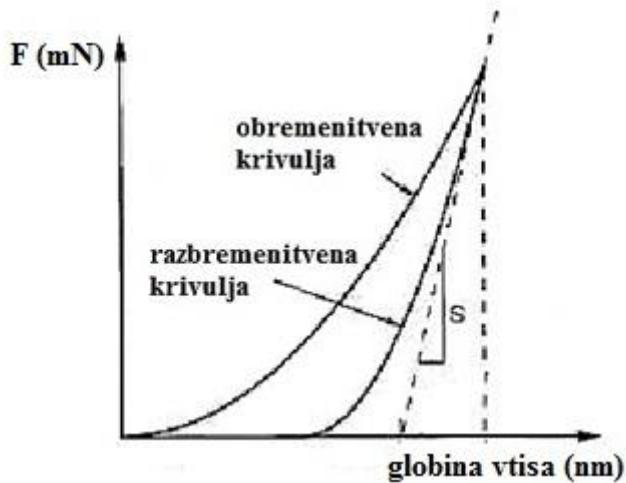
Slika 7: Shematičen prikaz plastične deformacije kristalov: a – prvoten kristal, b – zdrs, c – dvojčenje, d – upogibanje (14)

1.2 NANOINDENTACIJA

S poznavanjem mehanskih lastnosti na nivoju posameznega kristala lahko predvidevamo obnašanje snovi med tabletiranjem (15). Nanoindentacija je ena izmed metod za določanje nanomehanskih lastnosti snovi. Metoda je nedestruktivna in zahteva le minimalno količino vzorca (11, 14). To je še posebej prednost pri predformulacijskih raziskavah, saj imamo pogosto le omejeno količino snovi s katero lahko razpolagamo, predvsem v primeru zdravilnih učinkovin.

1.2.1 Tehnika nanoindentacije

Princip merjenja temelji na kontroliranem (območje $\mu\text{N} – \text{mN}$) vtiskovanju konice v preiskovani material. Osnovni rezultat, ki ga dobimo, predstavlja graf obremenitve (sile) v odvisnosti od globine vtisa (slika 8). Obremenitvena krivulja izraža elastično in plastično deformacijo, medtem ko razbremenitvena krivulja izraža elastično relaksacijo materiala (11).

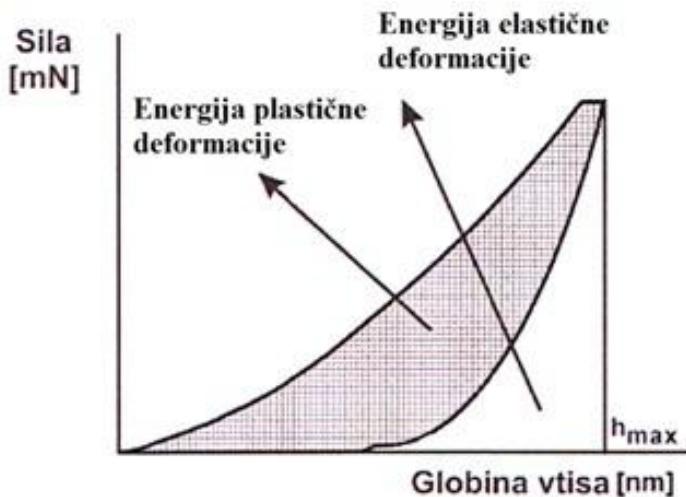


Slika 8: Graf obremenitve (F) v odvisnosti od globine vtisa. Iz naklona razbremenitvene krivulje izračunamo togost (S) (14)

Nanovtiskovanje se začne s približevanjem konice, dokler ta ne zazna površine vzorca, na osnovi nastavljene vrednosti togosti stika. Nato se prične kontrolirano vtiskovanje konice v vzorec, ki se ustavi ob doseženi maksimalni sili ali globini konice. Pri maksimalni obremenitvi, konica zastane nekaj sekund v materialu zaradi izključitve časovno-odvisne plastične deformacije v razbremenitveni fazi. Nato nastopi kontrolirana dekompresija vzora in konica se vrne v začetni položaj. Med ciklom se beležita *sila* (obremenitev) in *globina vtisa* konice (14).

Na podlagi analize krivulje *obremenitev/globina vtisa* in z upoštevanjem geometrije konice (največkrat se uporablja tristrana diamantna prizma po *Berkovichu*) lahko izračunamo *vtisno trdnost* (H), *Young-ov modul* (E), ki je merilo za togost in *elastično* ter *plastično energijo*. *Togost* (S) pri klasičnem postopku vtiskovanja določimo iz naklona razbremenitvene krivulje (11). Enačbe *Oliver-Pharr-ove teorije* so opisane v literaturi (16).

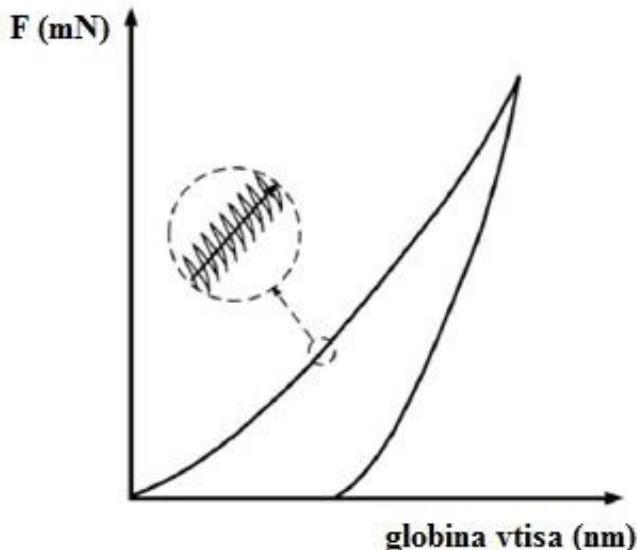
Integrirana površina med obremenitveno in razbremenitveno krivuljo na grafu *obremenitev/globina vtisa* (slika 9) nam predstavlja energijo plastične deformacije, površina pod razbremenitveno krivuljo pa energijo elastične deformacije (11).



Slika 9: Totalna energija deformacije (seštevek plastične in elastične deformacije) (11)

1.2.2 Tehnika kontinuiranega merjenja togosti

Nanoindenter G200 (Agilent Technologies, ZDA) nam omogoča tudi uporabo tehnike kontinuiranega merjenja togosti (ang. *Continuous Stiffness Measurement* - CSM). CSM je izboljšava klasičnega postopka nanoindentacije, saj nam omogoča kontinuirano merjenje globine in izračun mehanskih lastnosti v procesu obremenitve. To dosežemo s dinamičnim nihanjem sile v obremenitvenem delu krivulje. Pri vsaki določeni globini vtisa merimo fazni zamik (slika 10). Tako lahko spremljamo vrednosti E in H v odvisnosti od *globine vtisa* (14).



Slika 10: Prikaz modificirane CSM metode nanoindentacije – sila v odvisnosti od globine vtisa (17)

Vrednosti mehanskih parametrov E in H pridobimo iz obremenitvene krivulje s pomočjo spodnjih izračunov.

$$K = (S^{-1} + K_f^{-1}) + K_S \quad \text{Enačba 2}$$

K – togost stika konice s površino vzorca

K_f – togost ogrodja nanoindenterja

K_S – togost blažilnih vzmeti

Togost vzorca (S) in dušenje ob kontaktu ($D_s\omega$) sta podana z enačbama 3 in 4:

$$S = \left(\frac{1}{\frac{F_0}{z_0} \cos \phi - (K_s - m\omega^2)} - \frac{1}{K_f} \right)^{-1} \quad \text{Enačba 3}$$

$$D_s \omega = \frac{F_0}{z_0} \sin \phi - D_i \omega \quad \text{Enačba 4}$$

Pred meritvijo nastavimo vrednost *vzbujevalne frekvence* (ω). Med meritvijo izmerimo *amplitudo vibracij* (F_0), *premik amplitudo* (z_0) in *spremembo faznega osciliranja* (ϕ). Faktor dušenja D_i , K_s , K_f in m pa so parametri aparature, ki jih določi proizvajalec (18, 19).

E (*Young-ov modul*) vzorca izračunamo iz enačbe 5 (16).

$$\frac{1}{E_r} = \frac{1 - v_s^2}{E} + \frac{1 - v_i^2}{E_i}$$
Enačba 5

E_i - elastični modul indenterja (za diamantni tip: $E_i = 1141$ GPa)

v_i - Poissonovo razmerje indenterja (za diamantni tip: $v_i = 0.07$).

Reducirajoči elastični modul (E_r) je podan z enačbo 6.

$$E_r = \frac{\sqrt{\pi}}{2\beta} \frac{S}{\sqrt{A_c}}$$
Enačba 6

A_c je projecirana kontaktna površina, β je konstanta, ki je odvisna od geometrije indenterja. A_c je določena s pomočjo enačbe 7 (16).

$$A = f(h_c)$$
Enačba 7

$$h_c = h_{max} - \varepsilon \left(\frac{P_{max}}{S} \right)$$
Enačba 8

h_c - globina vtisa

h_{max} - maksimalna globina vtisa

ε - je geometrična konstanta *Berkovich* konice

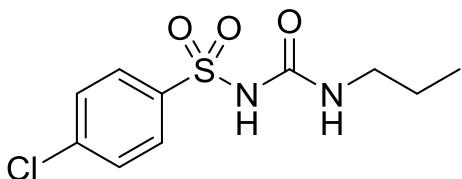
P/S - obseg elastične relaksacije

Iz razmerja sile (P) in projicirane kontaktne površine (A_c) izračunamo vtisno trdnost (H) (16):

$$H = \frac{P}{A_c}$$
Enačba 9

1.3 KLORPROPAMID

Klorpropamid je sulfonilsečninski peroralni antidiabetik 1. generacije. Učinkovit je le pri sladkornih bolnikih tipa 2, saj je njegovo mesto delovanja na beta celicah Langerhansovih otočkov. Njegovi receptorji se nahajajo na kalijevih kanalčkih, kjer blokirajo prehod kalija v celico. To povzroči depolarizacijo in vstop kalcija v celico, kar sproži sproščanje inzulina iz celice. Pri prevelikem odmerku ali oslabljenih ledvicah lahko pride do hipoglikemije, kar je največji neželeni učinek klorpropamida (20).



Slika 11: Struktura klorpropamida

1.3.1 Polimorfi klorpropamida

Klorpropamid se nahaja v večih polimorfnih oblikah, in točno število le teh, še ni poznano. Debrushchak za poimenovanje polimorfov klorpropamida predлага uporabo grških črk, glede na vrstni red odkritja polimorfa: α (III), β (II), γ (IV), δ (VI) in ε (I). V oklepaju je navedena nomenklatura, ki jo je predlagal Burger (21). V nadaljevanju smo uporabili poimenovanje, ki ga je predlagal Debrushchak.

NAMEN DELA

Namen magistrske naloge bo ugotoviti in pojasniti ali ima polimorfizem klorpropamida (strukturna ureditev) vpliv na njegove mehanske lastnosti. Na osnovi elastičnih in plastičnih lastnosti, bomo ocenili katera polimorfna oblika ima najprimernejše lastnosti za proces tabletiranja. Mehanske lastnosti bomo ovrednotili štirim polimorfnim oblikam klorpropamida; α , β , γ in δ .

Za identifikacijo polimorfnih oblik bomo uporabili diferenčno dinamično kalorimetrijo (DSC). Izmerjene termograme bomo primerjali s termogrami preteklih študij ter tako potrdili istovetnost polimorfnih oblik.

Metoda, ki nam bo omogočila določiti mehanske lastnosti, je instrumentalna nanoindentacija. Uporabili bomo tehniko kontinuiranega merjenja togosti (CSM). Mehanska parametra, ki ju bomo pridobili s to metodo, sta *Young-ov modul* in *vtisna trdnost*, na podlagi katerih bomo ocenili elastičnost in plastičnost. Glede na vrednost razmerij *Young-ov modul/meja plastičnosti* in *vtisna trdnost/meja plastičnosti* bomo polimorfom klorpropamida določili krhke ali žilave lastnosti. Mehanske lastnosti polimorfov klorpopamida bomo poskušali razložiti z opisom njihove strukture.

Vrednosti mehanskih parametrov bomo primerjali z mehanskimi parametri zdravilnih učinkovin (piroksikam I, famotidin A, famotidin B, nifedipin α in olanzapin I). Na ta način bomo lahko uvrstili polimorfne oblike klorpopamida med bolj ali manj primerne snovi za direktno tabletiranje, v primerjavi z drugimi kristalnimi zdravilnimi učinkovinami.

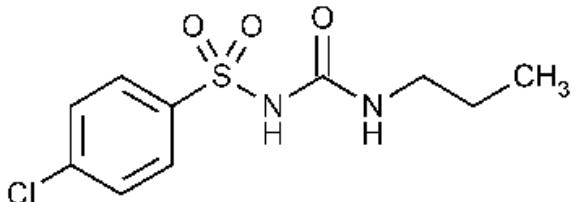
3 MATERIALI IN METODE

3.1 MATERIALI

3.1.1 Farmakološko aktivne snovi

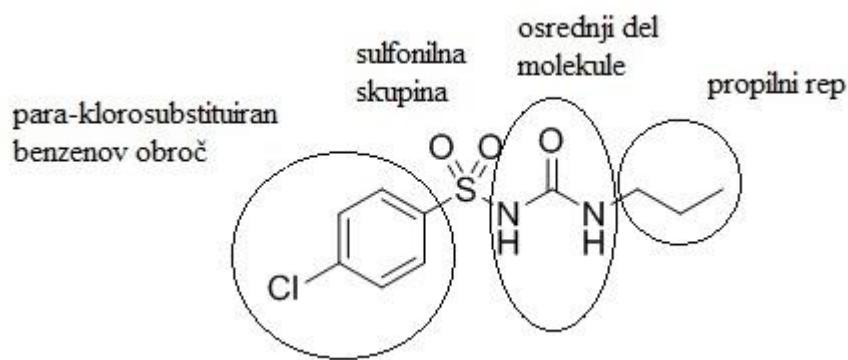
Polimorfe klorpropamida smo dobili v okviru sodelovanja s prof.dr.Boldyrevo in njeno skupino raziskovalcev (Institute of Solid State Chemistry and Mechanochemistry, Novosibirsk State University, Russia). Struktura kristalov, ki smo jih prejeli, je bila določena s pomočjo rentgenske praškovne difrakcije. V našem eksperimentu smo določili mehanske lastnosti štirim polimorfnim oblikam in sicer klorpropamidu α , β , γ in δ . Pri magistrski nalogi smo uporabili poimenovanje, ki ga je predlagal Debrushchak (21).

Preglednica II: Lastnosti klorpropamida

Strukturna formula	
Kemijska formula	C ₁₀ H ₁₃ ClN ₂ O ₃ S
Mednarodno nelastniško ime	klorpropamid
IUPAC ime	4-kloro-N-(propilkarbamoil)benzensulfonamid
Molekulska masa	276,74 g/mol
ATC klasifikacija	zdravila za bolezni prebavil in presnove, A10BB02

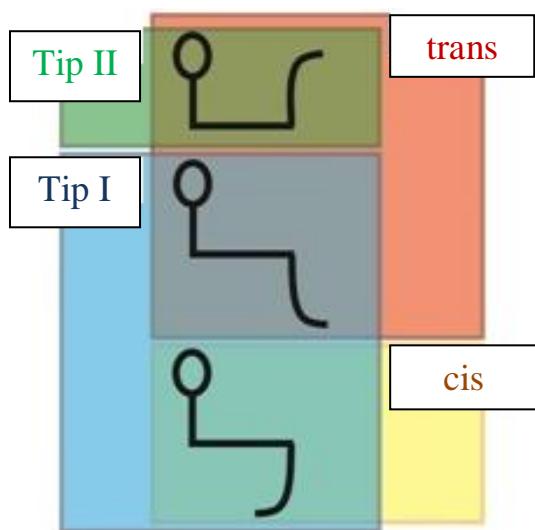
Videz	beli kristali
-------	---------------

Molekulo klorpropamida lahko razdelimo na centralni del (sulfonilsečninski strukturni element), ki vključuje atome N₁,C₇,N₂ in O₃, propilni rep ter para-klorosubstituiran benzenov obroč (slika 12). Zaradi fleksibilnosti propilnega repa ter benzenovega obroča tvorijo molekule klorpropamida več konformacijskih polimorfov. Poleg tega tudi sam propilni rep tvori različne prostorske ureditve. Osrednji del molekule ostaja enak pri vseh polimorfnih oblikah.



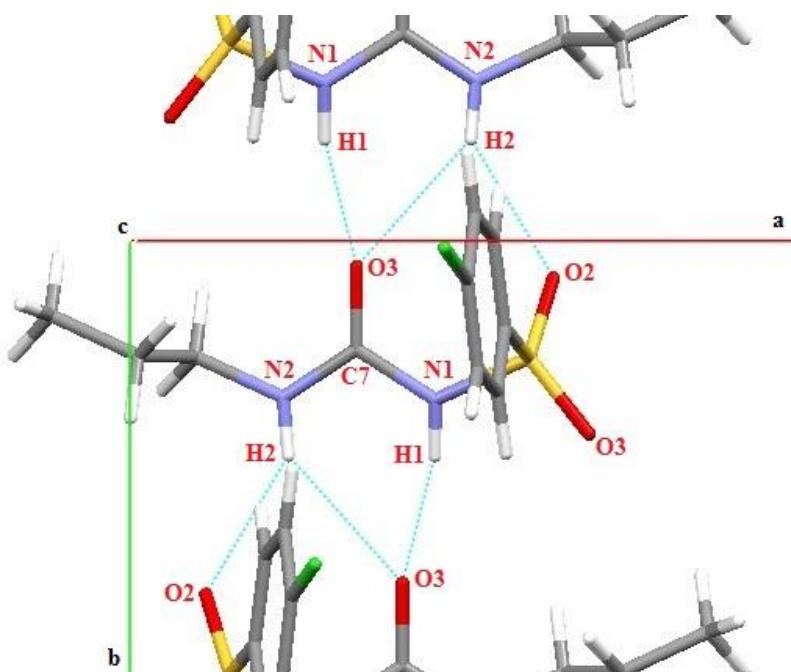
Slika 12: Struktura molekule klorpropamida

Razlika med posameznimi polimorfnimi oblikami je v orientaciji propilnega repa in benzenovega obroča glede na osrednji del molekule (slika 13). Kadar sta propilni rep in benzenov obroč na različnih straneh glede na centralni del molekule, označimo konformacijo s tipom I. Tip I je opazen pri klorpropamidu α in klorpropamidu δ . Benzenov obroč in propilni rep sta pri klorpropamidu β in klorpropamidu γ na isti strani glede na centralni del molekule. Tako konformacijo molekule imenujemo tip II. Propilni rep prav tako tvori dve različni konformaciji: trans (klorpropamid α , klorpropamid β in klorpropamid γ) in cis (klorpropamid δ).



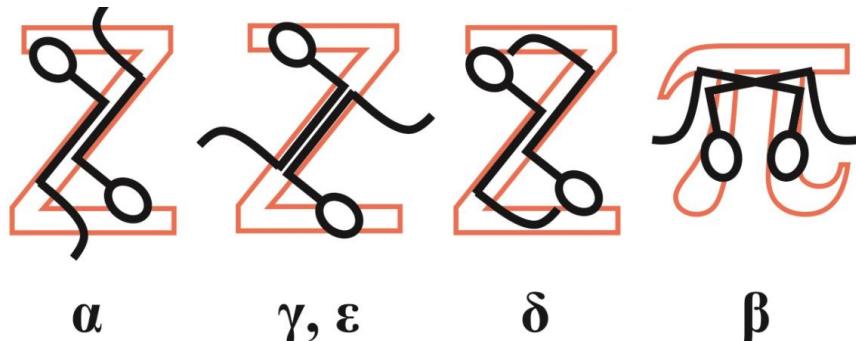
Slika 13: Konformacije polimorfnih oblik klorpropamida: klorpropamid α (tip I, trans), klorpropamid β (tip II, trans), klorpropamid γ (tip II, trans), klorpropamid δ (tip I, cis) (22)

Molekule klorpropamida so med seboj povezane z vodikovimi vezmi in tako tvorijo dolge verige med seboj povezanih molekul. Karbonilna skupina je preko vodikove vezi povezana z dvema NH skupinama na sosednji molekuli. Istočasno je na NH skupino povezana tudi preko kisikovega atoma sulfonilne skupine. Povezava dveh sosednjih molekul je prikazana na sliki 14.



Slika 14: Povezava dveh sosednjih molekul klorpropamida preko vodikovih vezi (22)

Ob povezovanju molekul klorpropamida obstajajo različne orientacije benzenovega obroča glede na ravnino vodikovih vezi. Najpogosteje sta benzenova obroča dveh sosednjih molekul klorpropamida na različnih straneh, glede na ravnino vodikovih vezi (tip Z). Taka orientacija se pojavi pri klorpropamidu α , klorpropamidu γ in klorpropamidu δ . Pri klorpropamidu β sta benzenova obroča na isti strani glede na ravnino vodikovih vezi (tip π) (22).



Slika 15: Osnovni motiv ureditve molekul klorpropamida (22)

3.1.2 Način priprave polimorfnih oblik

Polimorfne oblike klorpropamida, ki smo jih prejeli, so bile narejene po postopku prof.dr.Boldyreve in njene skupine raziskovalcev - Institute of Solid State Chemistry and Mechanochemistry, Novosibirsk State University, Russia.

Klorpropamid α : Je komercialno dostopna polimorfna oblika. Uporabljena je bila kot izhodna spojina za pripravo drugih polimorfnih oblik (21).

Klorpropamid β : Pridobljen je bil s pomočjo mešanice topil heptana in etilacetata. 2,5 ml heptana so nalili v erlenmajerico s klorpropamidom (87 mg) in segreli do temperature vrelišča. Na dnu erlenmajerice je del klorpropamida ostal neraztopljen. Po kapljicah so vreli raztopini dodajali etilacetat, dokler se ni raztoplil tudi preostali del klorpropamida. Vročo raztopino so filtrirali in pustili na sobni temperaturi do ohladitve. Po ohladitvi so se na dnu erlenmajerice pojavili majhni kristali, v obliki prosojnih ploščic milimetrske velikosti (22).

Klorpropamid γ : Vzorec je bil kristaliziran iz mešanice heptana in etilacetata (1:2). Kristalizacija je bila dosežena z zmrzovanjem (-20 °C) (22).

Klorpropamid δ : Vzorec je bil kristaliziran iz zmesi heptana (1 ml) in etilacetata (0.5 ml) (22, 23).

3.1.3 Laboratorijska oprema

Nanoindenter G200, Agilent Technologies, ZDA

DSC 1 Star System, Mettler Toledo, Švica

Analitska tehnika, Mettler Toledo AG245, Švica

Lepilo UHU Plus, Sofortfest Binder, UHU GmbH & Co. KG, Nemčija

Lepilo UHU Plus, Sofortfest Härter, UHU GmbH & Co. KG, Nemčija

Krovna stekelca

Pinceta z zavito konico

3.2 METODE

3.2.1 Diferenčna dinamična kalorimetrija (DSC)

DSC spada med metode za termično analizo. Omogoča nam zaznavanje toplotnih učinkov, ki so posledica kemijskih reakcij ali faznih sprememb – tališča, steklasti prehod, kristalizacija itd. Meritve temeljijo na ohranjanju temperaturnega razmerja med lončkom z vzorcem in referenčnim lončkom brez vzorca. Do spremembe v toplotnem toku pride zaradi termičnih efektov pri katerih se toplota sprošča (eksotermna reakcija) ali porablja (endotermna reakcija). Integracija površine pod krivuljo je energija, ki se v procesu sprosti ali porabi in jo izrazimo kot sprememba entalpije (ΔH). Rezultat termične analize je diagram toplotnega toka v odvisnosti od temperature, ki ga imenujemo termogram. Na podlagi zaznanih termičnih efektov in sprememb entalpij je mogoče okarakterizirati obnašanje vzorca med segrevanjem in ohlajanjem (24).



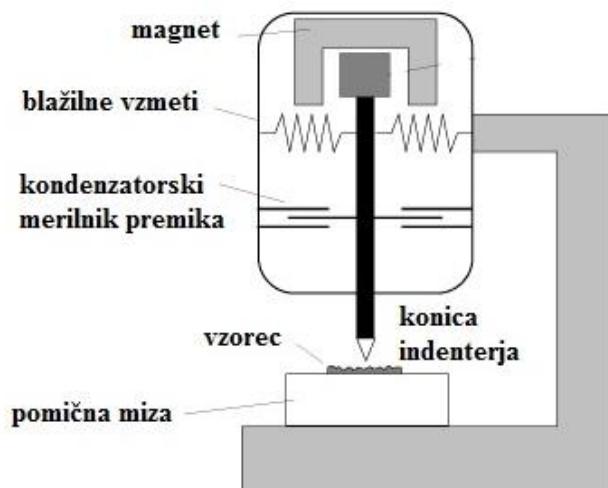
Slika 16: Diferenčni dinamični kalorimeter (DSC 1 Star System, Mettler Toledo, Švica)

3.2.2 Instrumentalna nanoindentacija

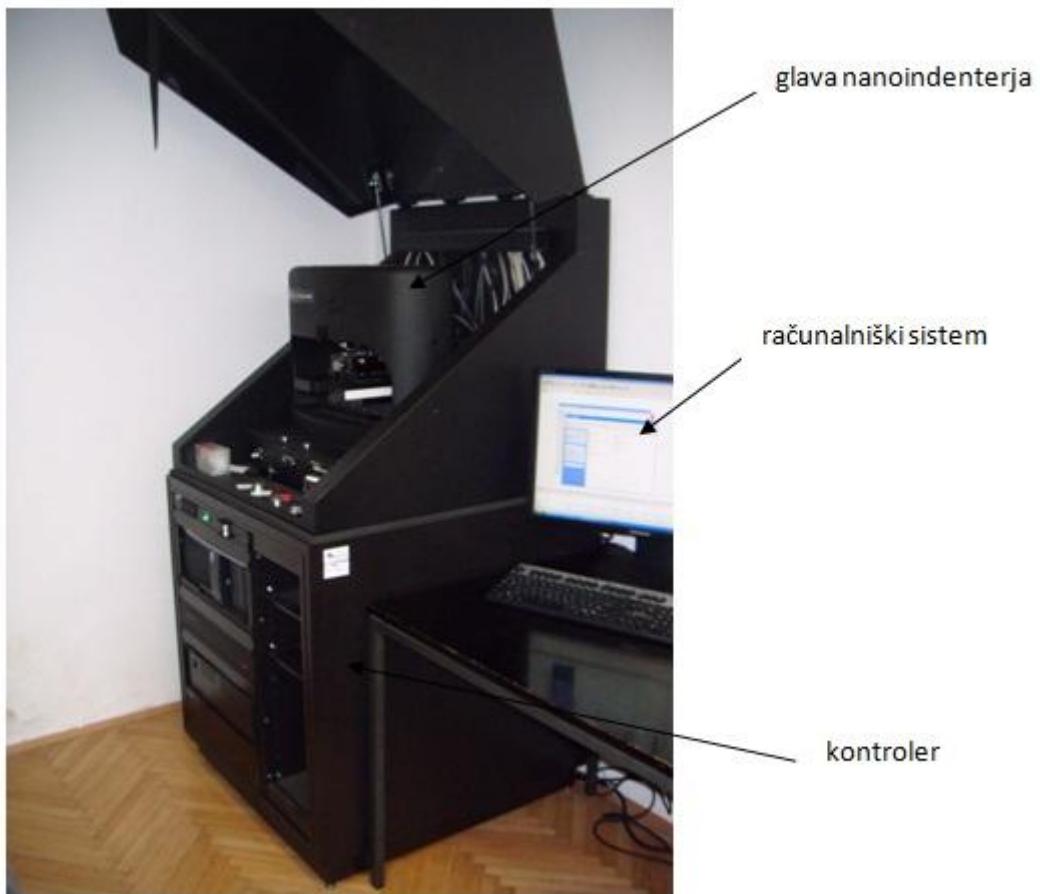
Mehanske lastnosti polimorfov klorpropamida smo vrednotili z instrumentalno nanoindentacijo. Pri tem smo uporabili tehniko kontinuiranega zaznavanja togosti stika (ang. *Continuous Stiffness Measurement - CSM*).

Princip delovanja temelji na kontrolirani elektromagnetni obremenitvi konice indenterja v vzorec. Kontrola obremenitve in merjenje sile je zelo natančno, v merilnem območju od 10 nN do 10 N. Pomiki so kontrolirani z merilnikom kapacitete in omogočajo merjenje pomikov z resolucijo 0,0002 nm. Pri tehniki CSM sila v obremenitvenem delu krivulje oscilira z več redov manjšo amplitudo v primerjavi s končno silo. Konica indenterja se vtisne v vzorec do maksimalne globine, ki jo nanoindenterju določimo sami. Kot rezultat meritev nam nanoindenter poda graf *obremenitev/globina vtisa* ter izračunan *Young-ov modu (E)* in *vtisno trdnost (H)* (11).

Nanoindentacijske meritve omogoča nanoindenter (sliki 17 in 18). Njegovi bistveni sestavni deli so visokoločljivostni tvorilec sile, ki omogoča kontrolirano vtiskovanje konice v material, konica (*Berkovich*) in visokoločljivostni senzor, ki meri globino vtisa v materialu.



Slika 17: Shematski prikaz nanoindenterja (25)



Slika 18: Nanoindenter G200, Agilent Technologies, ZDA

4 EKSPERIMENTALNO DELO

4.1 DIFERENČNA DINAMIČNA KALORIMETRIJA (DSC)

Vzorce smo natehtali v aluminijaste posodice na 0,01 mg natančno. Mase vzorcev:

$$m(\text{klorpropamid } \alpha) = 1,63 \text{ mg}$$

$$m(\text{klorpropamid } \beta) = 0,49 \text{ mg}$$

$$m(\text{klorpropamid } \gamma) = 3,93 \text{ mg}$$

$$m(\text{klorpropamid } \delta) = 2,72 \text{ mg}$$

Segrevali smo od 25 °C do 150 °C s hitrostjo 10 °C/min, v dušikovi atmosferi s pretokom 50 ml/min. Termograme smo analizirali s programsko opremo STAR Software ter določili temperaturo taljenja kristala in entalpijo termografskih vrhov.

4.2 INSTRUMENTALNA NANOINDENTACIJA

Meritve smo izvajali na dominantni ploskvi kristala. Kristale smo pritrdirili na krovno stekelce s pomočjo dvo-komponentne cianoakrilne smole. Krovno stekelce smo prilepili na kovinski nastavek, ki se vloži v nosilec premične mizice nanoindenterja. Nosilec premične mizice ima pet prostorov za pet nastavkov (slika 19). Sredinski prostor je namenjen za referenčni vzorec (posamezni kristal aluminija, silika), preostali pa nastavkom z vzorci.



Slika 19: Nosilec vzorcev, Nanoindenter G200, Agilent Technologies, ZDA (19)

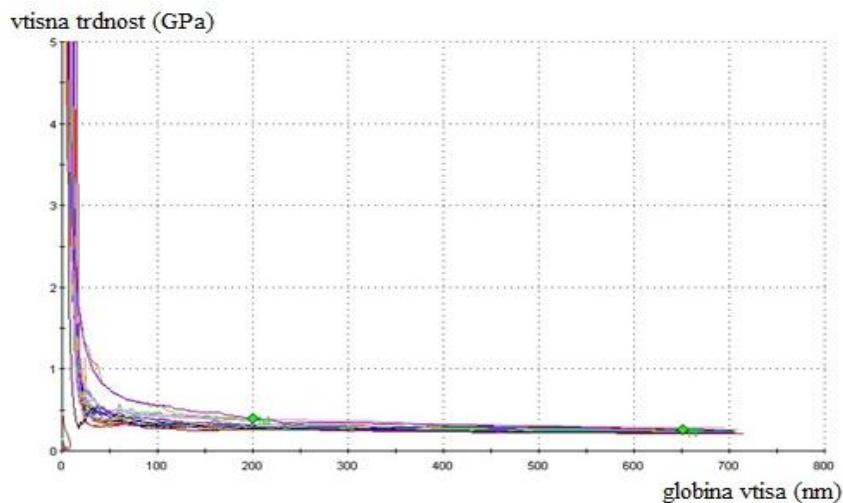
Pri meritvah smo uporabili konico v obliki tristrane diamantne piramide (po *Berkovichu*). Povečava mikroskopa je bila 60X. Rezultati so izračunani iz vrednosti pridobljenih med 200 nm do 700 nm globine vtisa. Nanoindenter je povezan s računalniškim programom NanoSuit, s pomočjo katerega smo nastavili pogoje meritev:

- amplituda nihanja: 2 nm,
- frekvenca nihanja: 45 Hz,
- maksimalna globina vtisa: 700 nm,
- Poissonovo razmerje: 0,3.

Število vtisov na posamezni površini kristala je variiralo od 10 do 25 in je bilo odvisno od velikosti in kakovosti površine kristala. Za vsako polimorfno obliko smo izvedli meritve na

treh do štirih kristalih. Za ugotavljanje načina porazdelitve smo izmerjene vrednosti preverili s pomočjo Shapiro-Wilkov in Kolmogorov-Smirnove metode. Shapiro-Wilkov in Kolmogorov-Smirnov test sta neparametrična testa, ki ju uporabljamo za preverjanje ničelne domneve, da je preučevana porazdelitev, enaka normalni porazdelitvi. Ničelne domneve ne zavrnemo v primeru, ko je verjetnost večja od 0,05. Rezultat našega testa je pokazal, da večina meritve ni normalno porazdeljena. Rezultate meritve smo zato podali kot mediane *Young-ovega modula* in *vtisne trdnosti*, saj je ta, v primeru nenormalne porazdelitve, za interpretacijo rezultatov ustreznejša.

Upoštevali smo, da Oliver-Pharrova teorija velja na globini, ki je vsaj 2-krat večja od velikosti konice indenterja (26). Rezultate smo zato ovrednotili na globini od 200 nm do maksimalne globine vtisa, kar je v našem primeru znašalo 700 nm. Če so meritve izvedene pravilno, se krivulje na grafu *Young-ov modul/globina vtisa* in grafu *vtisna trdnost/globina vtisa* (slika 20) za posamezen vzorec, bližajo konstantni vrednosti, ki predstavlja vrednost *Young-ovega modula* oziroma *vtisne trdnosti* (26).

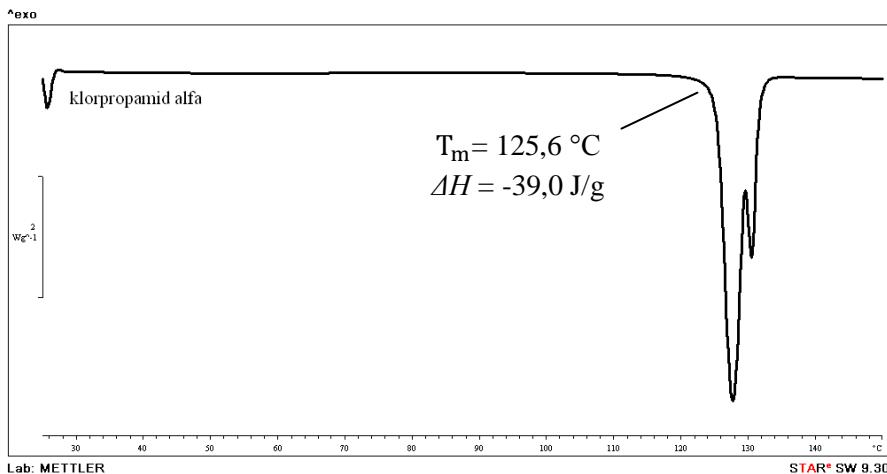


Slika 20: Graf vtisna trdnost/globina vtisa – klorpropamid α

Pri izvedbi instrumentalne nanoindentacije je bilo pomembno, da smo za vtis konice izbrali kristal z ohranjeno kristalno celico brez površinskih razpok, saj te vplivajo na natančnost merjenja na nanometrskem nivoju. Za natančno merjenje je bilo pomembno tudi to, da smo kristal dobro pritrdirili na krovno stekelce. Pri tem dvo-komponentna cianoakrilna smola ni smela prekriti kristala.

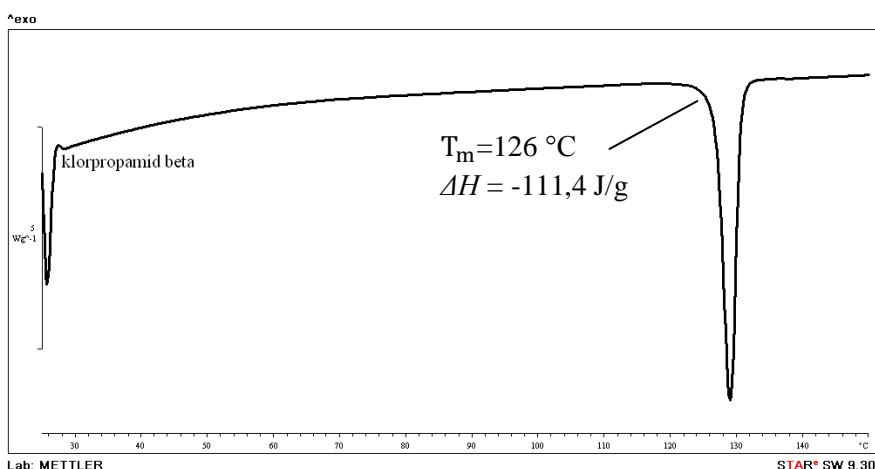
5 REZULTATI IN RAZPRAVA

5.1 DIFERENČNA DINAMIČNA KALORIMETRIJA (DSC)



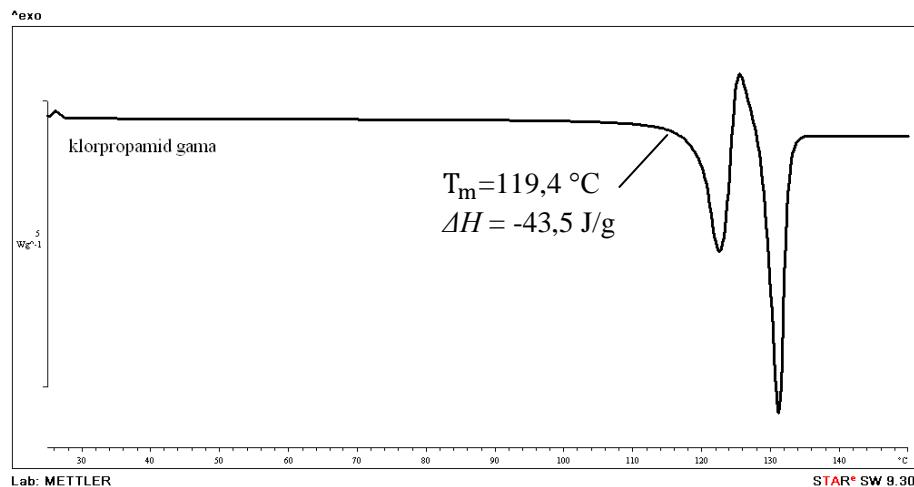
Slika 21: Termogram klorpropamida α

Na termogramu klorpropamida α opazimo pri $125,6\text{ }^{\circ}\text{C}$ taljenje kristala ter nato pretvorbo v drugo polimorfno obliko. V različnih študijah so ugotovili da klorpropamid α prehaja v klorpropamid ϵ (21, 22). Pretvorba polimorfne oblike in nato taljenje klorpropamida ϵ se pri našem termogramu prične pri $129,5\text{ }^{\circ}\text{C}$, kar se sklada s termogrami drugih študij (22). Določena temperatura tališča se sklada z termogrami iz literature ($T_m=125,2\text{ }^{\circ}\text{C}$) (22).



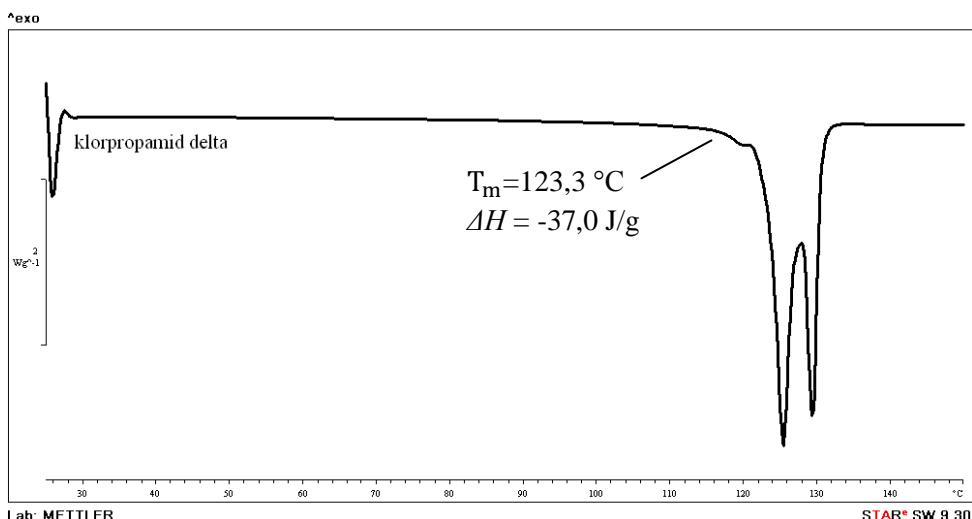
Slika 22: Termogram klorpropamida β

Na termogramu klorpropamida β opazimo endotermen vrh, ki nastopi pri $126,8\text{ }^{\circ}\text{C}$ z entalpijo $111,4\text{ J/g}$. Rezultati termične analize se ujemajo z literurnimi podatki (22).



Slika 23: Termogram klorpropamida γ

Na kromatogramu klorpropamida γ lahko opazimo prvi endotermni vrh z začetkom pri $119,4\text{ }^{\circ}\text{C}$, ki je posledica taljenja klorpropamida γ . Pri temperaturi $124,4\text{ }^{\circ}\text{C}$ poteče popolna pretvorba v klorpropamid ϵ (prekristalizacija), kar opazimo kot spremembo krivulje v smeri eksotermne reakcije. Toplotna energija se pri pretvorbi polimorfne oblike kristala sprošča. Sledi taljenje nastalega klorpropamida ϵ pri $128,5\text{ }^{\circ}\text{C}$.



Slika 24: Termogram klorpropamida δ

Termogram klorpropamida δ je podoben termogramu α . Prisotna sta dva endotermna vrhova pri 123,3 °C in 128,1 °C. Prvi vrh prikazuje taljenje klorpropamida δ . Po taljenju klorpropamida δ prehaja v klorpropamid ε . To potrditev nam daje drugi endotermni vrh z pričetkom pri 128,1 °C, ki je posledica taljenja klorpropamida ε .

Izmerjeni termogrami se zelo dobro ujemajo s termogrami drugih študij (22), iz česar lahko sklepamo na istovetnost polimorfov, uporabljenih pri naših meritvah. Segrevanje vseh štirih polimorfnih oblik povzroči prehod v peto polimorfno obliko – klorpropamid ε . Nekatera manjša odstopanja smo opazili pri izmerjenih entalpijah, ki so lahko posledica različne mase vzorca ter višje hitrosti segrevanja.

Skupna entalpija vseh procesov je sestavljena iz seštevka entalpije prehoda polimorfne oblike in entalpije taljenja nastalega klorpropamida ε (22). Pretekle študije (22) so izmerile entalpijo taljenja klorpropamida ε , ki znaša 87 J/g. Na podlagi te vrednosti, lahko izračunamo vrednost entalpije prehoda posamezne polimorfne oblike v klorpropamid ε . Primer za klorpropamid α :

$$\Delta H(\alpha) = \Delta_{tr}H(\alpha \rightarrow \varepsilon) + \Delta_mH(\varepsilon) \quad \text{Enačba 10}$$

Najvišja vrednost entalpije prehoda v ε obliko je pri prehodu polimorfnih oblik α in γ , zaradi česar predvidevamo na njuno visoko stabilnost pri sobnih pogojih.

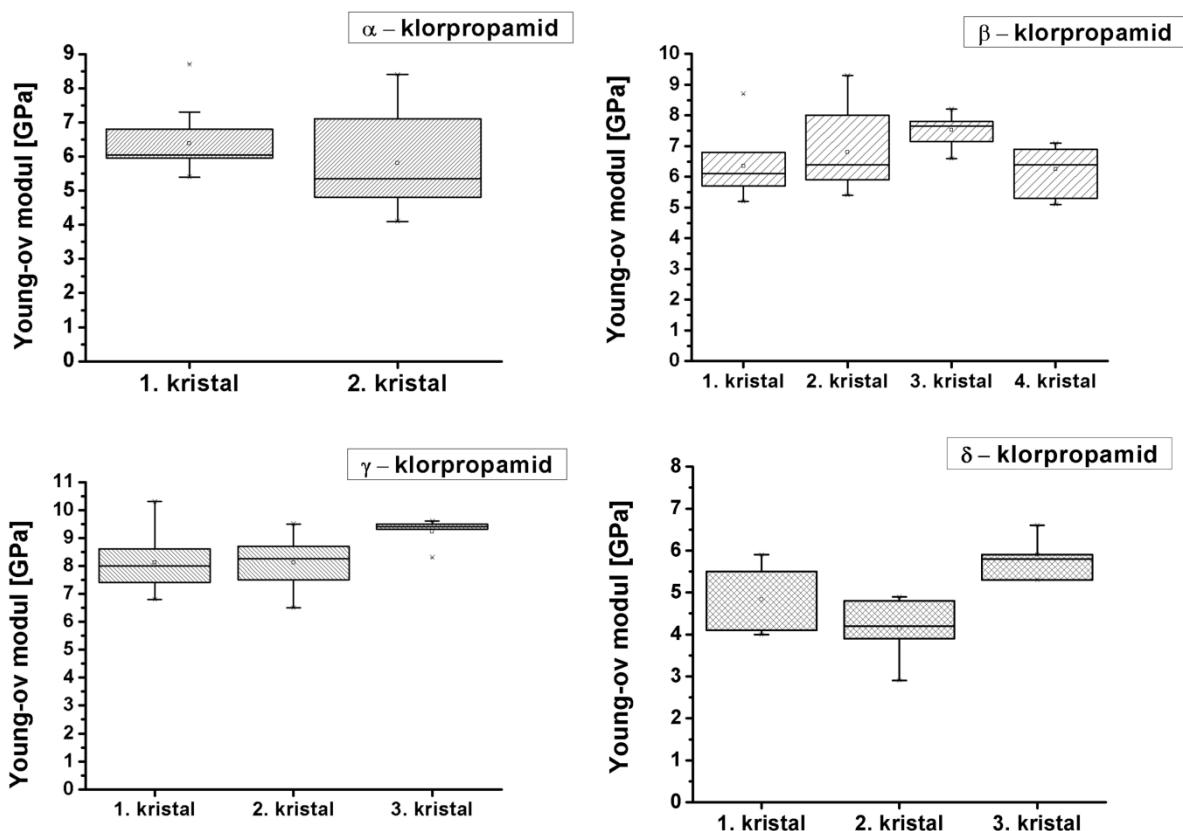
Podatki iz literature (22) navajajo najnižjo vrednost entalpije taljenja pri polimorfni obliki β ($\Delta H = 84$ J/g). Naš rezultat entalpije taljenja klorpropamida β je višji od klorpropamida δ , kar se ne ujema s podatki iz omenjene literature. Meritve, ki bi nam potrdila izmerjeno vrednost entalpije za obliko β žal nismo mogli ponoviti, saj smo imeli omejeno količino kristalov. Na podlagi enačbe 10, bi moral biti prehod klorpropamida β v klorpropamid ε spontan, saj naj bi bila njegova entalpija prehoda najnižja – celo negativna. Kljub temu navajajo (22) prehod klorpropamida $\beta \rightarrow \varepsilon$ kot zelo počasen. Razloga za to izhaja iz strukturne posebnosti klorpropamida β . Pri polimorfu β se mora vsaka druga molekula klorpropamida β zasukati v smeri urinega kazalca, da benzenovi obroči zasedejo enako orientiranost, kot jo imajo druge polimorfne oblike. Pri tem se morajo prekiniti vodikove

vezi sosednjih molekul. To je možno le med taljenjem. Zato se prehod klorpropamida $\beta \rightarrow \epsilon$ doseže le pri počasnem segrevanju (22).

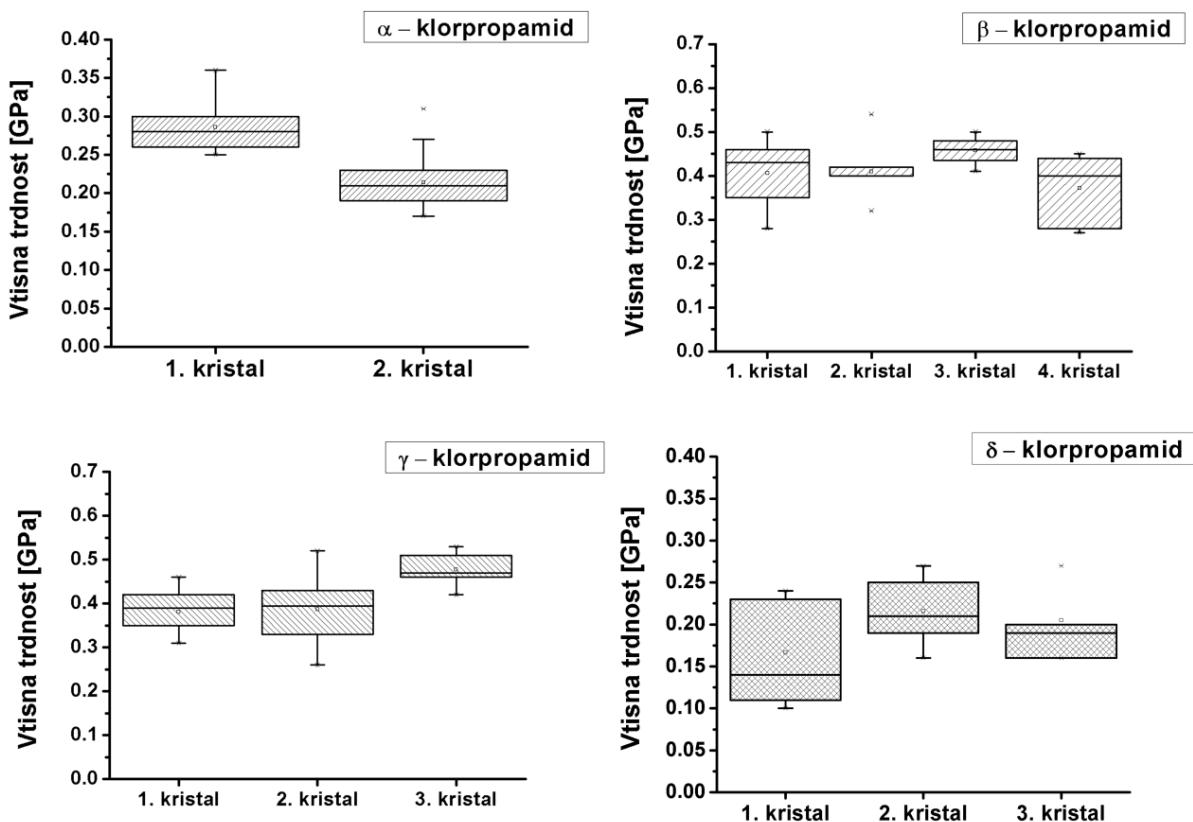
5.2 VPLIV KONFORMACIJSKEGA POLIMORFIZMA NA NAČIN DEFORMACIJE KRISTALOV KLORPROPAMIDA

5.2.1 Vrednotenje mehanskih lastnosti polimorfnih oblik klorpropamida z instrumentalno nanoindentacijo

S tehniko instrumentalne nanoindentacije smo določili E in H polimorfnim oblikam klorpropamida na več kristalih.



Slika 25: Kvartilni diagram (ang. Box Plot), za vrednosti Young-ovega modula polimorfnih oblik klorpropamida



Slika 26: Kvartilni diagram (ang. Box Plot), za vrednosti vtisne trdnosti polimorfnih oblik klorpropamida

Klorpropamid δ ima nekoliko višjo razpršenost podatkov, ki je v povezavi z možnimi kristalnimi defekti na površini delca (tanek kristal, prisotnost neravnin in por na površini). Na osnovi Box-Plot grafov za E in H ni razvidna izrazita površinska anizotropija kristalov in so razlike v rezultatih med posameznimi kristali statistično neznačilni.

Dodatna parametra za vrednotenje deformacijskih lastnosti kristalov sta *meja plastičnosti* (P_y) ter njeno razmerje s H in E . Naše vrednosti razmerja P_y s H in E smo dobili s pomočjo poenostavljene oblike enačbe, ki jo je predlagal Marsh (27):

$$\frac{H}{P_y} = 0,07 + 0,6 \ln \frac{E}{P_y} \quad \text{Enačba 11}$$

Razmerji E/P_y in H/P_y uporabljamo za opis deformacijskega mehanizma različnih materialov (27):

- kadar je razmerje E/P_y med 10-25 oziroma razmerje H/P_y med 1,5-2,0; materiali s primarno elastično deformacijo.
- razmerje E/P_y med 25-30 oziroma razmerje H/P_y med 2,0-2,2 je značilno za krhke materiale
- razmerje E/P_y nad 300 oziroma razmerje H/P_y nad 3,0 je značilno za plastične materiale

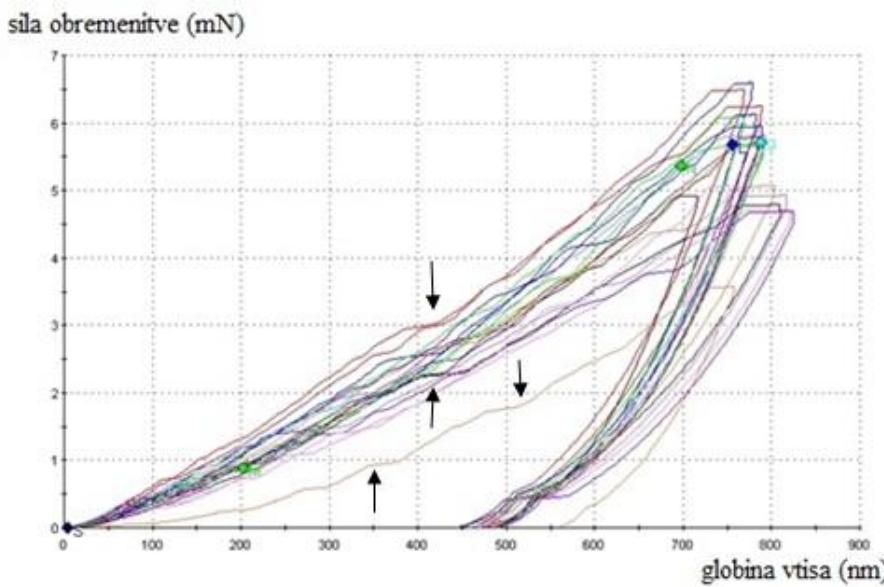
Vrednosti H in E , pridobljene z meritvami na nanoindenterju, ter njuno razmerje s P_y so predstavljene v preglednici III.

Preglednica III: Vrednosti mehanskih parametrov E , H , P_y , E/P_y in H/P_y za polimorfe klorpropamida

Polimorfi	Klorpropamid α	Klorpropamid β	Klorpropamid γ	Klorpropamid δ
$E [GPa]$	$5,9 \pm 1,8$	$6,8 \pm 1,6$	$8,4 \pm 1,4$	$4,9 \pm 1,7$
$H [GPa]$	$0,24 \pm 0,07$	$0,43 \pm 0,07$	$0,39 \pm 0,08$	$0,19 \pm 0,08$
$Py [MPa]$	93,8	195,5	159,3	159,3
E/Py	63,5	34,8	52,4	30,8
H/Py	2,6	2,2	2,5	2,5
Mehanske lastnosti	krhek/plastičen	krhek/elastičen	krhek/plastičen	krhek/elastičen

Vsi materiali imajo predvsem krhke lastnosti. Potencialen mehanizem deformacije materialov po lomljenju je lahko plastičen (klorpropamid α) oziroma elastičen (klorpropamid β , klorpropamid γ in klorpropamid δ), kar je značilno za večino kristalnih učinkovin. Najnižji P_y smo določili klorpropamidu α , kar pomeni, da prehod elastične deformacije v plastično poteče pri nižji obremenitvi, v primerjavi z drugimi polimorfnimi oblikami. Pod obremenitvijo se bo torej klorpropamid α deformiral pretežno s plastično deformacijo, kar je zaželena lastnost tekom tabletiranja.

Pri klorpropamidu δ smo na grafu *obremenitev/globina vtisa* (slika 27) opazili zanimiv pojav pop-in. Pop-in lahko opazimo na obremenitveni krivulji kot nenadno povečanje globine vtisa ob enaki sili obremenitve. Je lahko posledica zloma (fragmentacije) posameznih ravnin saj so kristali klorpopamida δ tanki in smo uporabili silo, ki presega nivo plastične deformacije. To hipotezo bomo preverili pri nadaljnji raziskavi nanomehanskih lastnosti klorpropamidov ob uporabi manjše sile stiskanja.



Slika 27: Graf obremenitev/globina vtisa s označenimi pop-ini – klorpropamid δ

5.2.2 Povezava mehanskih lastnosti polimorfnih oblik klorpropamida z njihovo strukturo

Mehanske lastnosti, ki smo jih določili polimorfnim oblikam lahko razložimo s pomočjo opisa njihove strukture.

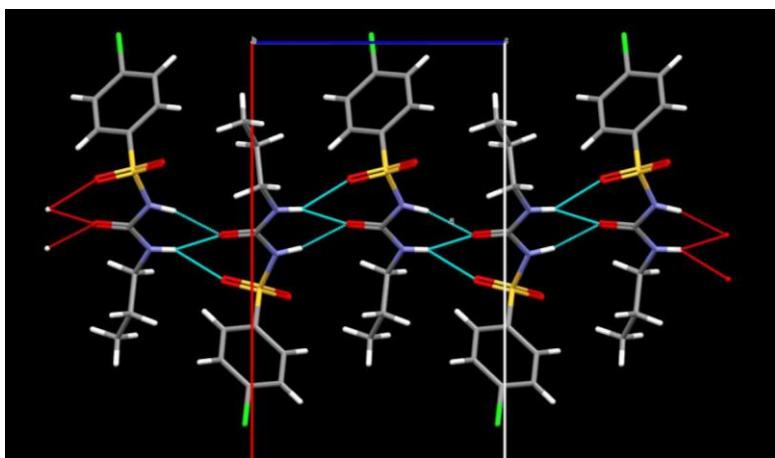
Preglednica IV: Strukturne lastnosti, interakcijske energije in izračunana prava gostota polimorfnih oblik klorpropamida – α , β , γ in δ (Jernej Stare, neobjavljeni rezultati, density functional theory)

Oblika	Orientacija propilne skupine	Konformacija propilnega fragmenta	Osnovni motiv ureditve molekul	Interakcijske energije [kcal/mol]	Izračunana prava gostota [g/cm ³]
α	I	trans	z-tip	deformacija b osi: 14.25 deformacija a osi: 5.05	1.450
β	II	trans	π -tip	deformacija c osi: 6.20 deformacija a osi: 10.76	1.389
γ	II	trans	z-tip	deformacija c osi: 6.07 deformacija a osi: 13.28	1.416
δ	I	cis	z-tip	deformacija c osi: 6.07 deformacija b osi: 13.28	1.455

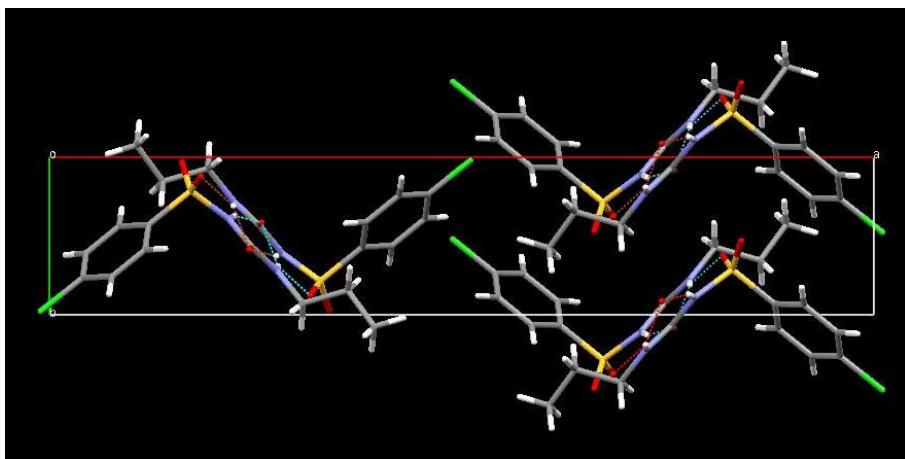
5.2.2.1 Klorpropamid α

Vodikove vezi v klorpropamidu α so orientirane vzdolž kristalografske osi c . Parameter kristalne celice b je postavljen normalno na trakove (ang. ribbons) iz vodikovih vezi in označuje razdaljo med sosednimi trakovi. Molekule znotraj trakov vodikovih vezi so nasprotno orientirane in so raztegnjene vzdolž osi a .

Raven bc odgovarja dominantni kristalni ploskvi (001). Kristalografska os a je normalna na raven bc . Raven ac pa ustreza manjši kristalni ploskvi (100). Med nanoindentacijskim ciklom dominantne kristalne ploskve (001) smo deformirali kristal v smeri a , za katero je značilna nižja interakcijska energija (5,05 kcal/mol) v primerjavi z deformacijo kristalne ravnine ac .



Slika 28: Ureditev vodikovih vezi v kristalni strukturi klorpropamida α (rdeča črta: os a , modra: os c)
(Raziskovalna skupina prof. E. Boldyreva, neobjavljeni rezultati)



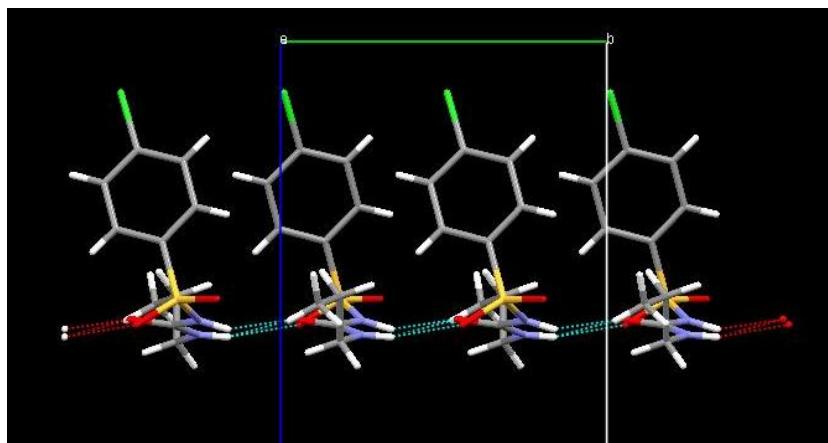
Slika 29: Ureditev molekul (Z tip) v kristalni strukturi klorpropamida α (rdeča črta: os a, zelena črta: os b) (Raziskovalna skupina prof. E. Boldyrev, neobjavljeni rezultati)

Nižja interakcijska energija med kristalnimi ravninami v smeri a ustreza manjšemu E in H klorpropamida α . Posledično smo klorpropamidu α izmerili nižji P_y , kar pomeni, da je obremenitev, ki je potrebna za plastično deformacijo nižja v primerjavi z drugimi polimorfnimi oblikami.

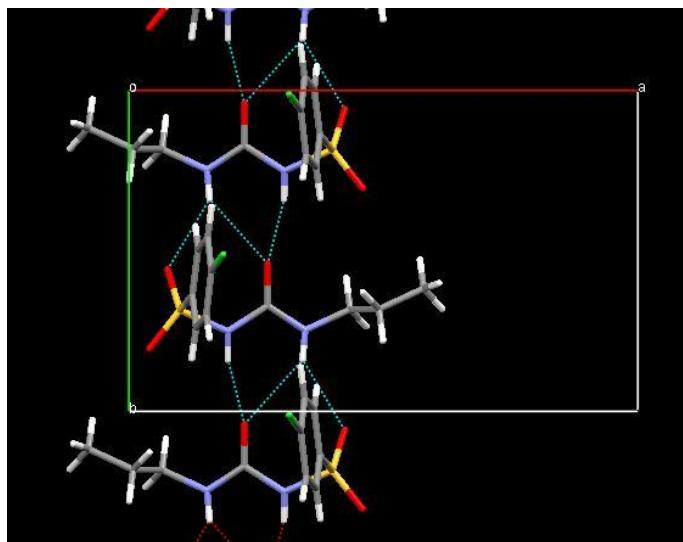
5.2.2.2 Klorpropamid β

Verige vodikovih vezi so v klorpropamidu β orientirane vzdolž kristalografske osi b . Parameter a označuje razdaljo med sosednjimi trakovi. Molekule znotraj trakov vodikovih vezi so nasprotno orientirane in so raztegnjene vzdolž osi a . Odsotnost prostega prostora med sosednjimi molekulami v smeri a ima za posledico višjo interakcijsko energijo (10,76 kcal/mol) v primerjavi z interakcijsko energijo vzdolž osi c (6,20 kcal/mol).

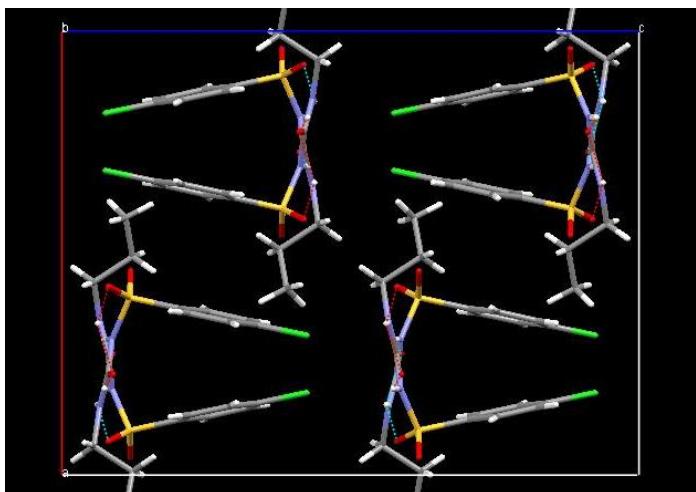
Trakovi vodikovih vezi ležijo vzdolž ravni ab , ki odgovarja dominantni kristalni ploskvi (001). Ravni ac oziroma bc ustreza kristalnim ploskvama 100 in 010. Med nanoindentacijskim ciklom smo stiskali dominantno kristalno ploskev 001, oziroma je bila smer deformacije normalna glede na orientacijo vodikovih vezi. Združ molekul v klorpropamidu β je možen vzdolž kristalografske osi b oziroma v smeri verig iz vodikovih vezi.



Slika 30: Vodikove vezi v kristalni strukturi klorpropamida β (zelena črta: os b, modra: os c) (Raziskovalna skupina prof. E. Boldyreva, neobjavljeni rezultati)



Slika 31: Vodikove vezi v kristalni strukturi klorpropamida β vzdolž c osi (rdeča črta: os a, zelena: os b) (Raziskovalna skupina prof. E. Boldyreva, neobjavljeni rezultati)

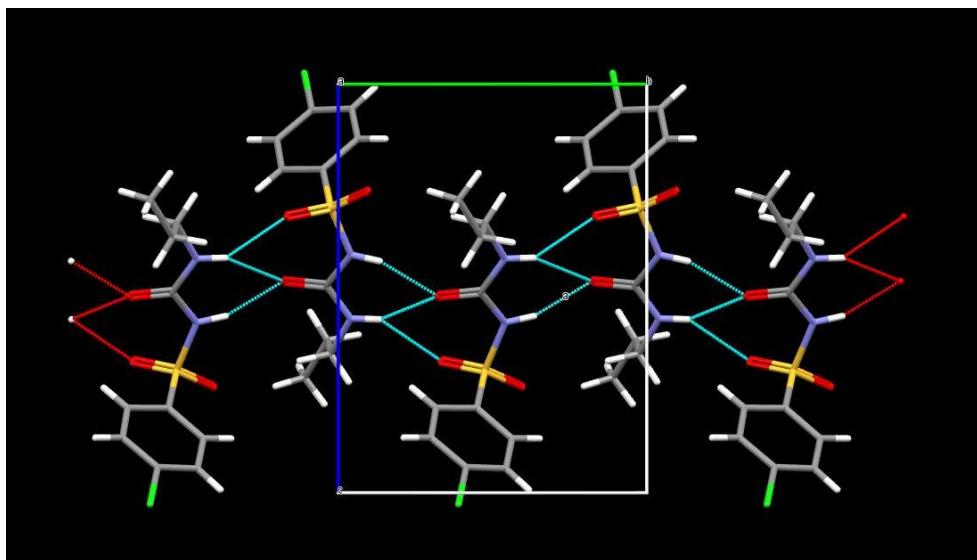


Slika 32: Ureditev molekul (π tip) v kristalni strukturi klorpropamida β vzdolž b osi (rdeča črta: os a, modra črta: os c) (Raziskovalna skupina prof. E. Boldyрева, neobjavljeni rezultati)

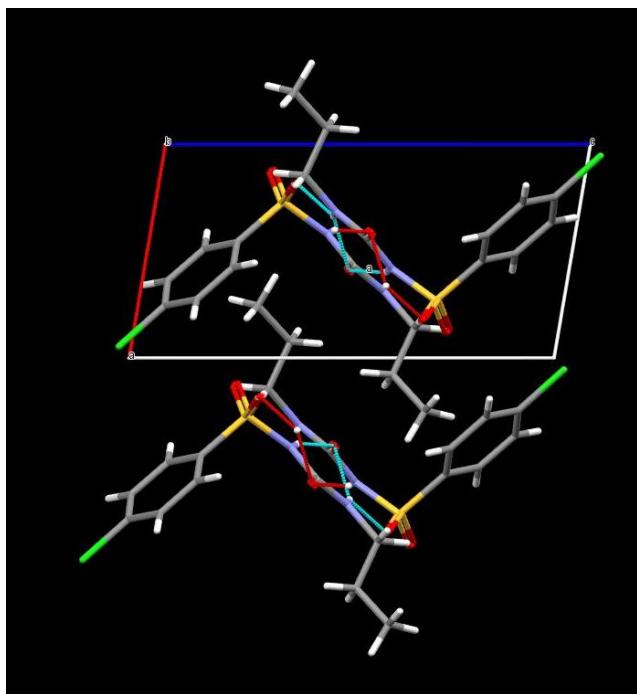
V primerjavi s klorpropamidom α je stiskanje dominantne ploskve klorpropamida β vodilo k višji vrednosti mehanskih parametrov E in H , kar je v soglasju z višjo interakcijsko energijo. Manjša plastičnost klorpropamida β je lahko posledica odsotnosti prostega prostora med sosednjimi molekulami. Poleg tega smo kristal klorpropamida β vtiskovali v smeri c , kjer ni možen zdrs molekul.

5.2.2.3 Klorpropamid γ

Vodikove vezi v klorpropamidu γ so orientirane vzdolž kristalografske osi b . Parameter a označuje razdaljo med sosednjimi trakovi. Molekule znotraj trakov vodikovih vezi so nasprotno orientirane in raztegnjene v smeri c . Kristalna celica klorpropamida γ je definirana kot monoklinska. Kristalografske osi niso ortogonalne, kot pri ostalih polimorfnih oblikah. Kristalografska os b je usmerjena vzdolž kristalnih ploskev 001 in 100 ter tudi normalno na najmanjšo kristalno ploskev 010 (ustreza ravni ac). Plastična deformacija, kot posledica zdrsa kristalnih ravnin, je pričakovana vzdolž kristalografske osi b oziroma v smeri vodikovih vezi.



Slika 33: Vodikove vezi v kristalni strukturi klorpropamida γ vzdolž osi a (zelena črta: os b, modra: os b) (Raziskovalna skupina prof. E. Boldyreva, neobjavljeni rezultati)



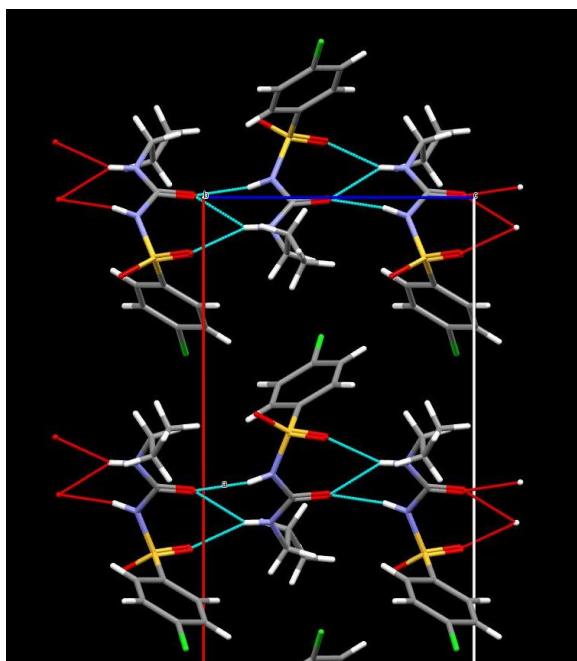
Slika 34: Ureditev molekul (tip Z) v kristalni strukturi klorpropamida γ vzdolž osi b (rdeča črta: os a, modra črta: os c) (Raziskovalna skupina prof. E. Boldyreva, neobjavljeni rezultati)

Na sliki 34 lahko opazimo ureditev molekul, ki je značilna za tip Z (»zig-zag« urejenost kristalnih plasti). Vtiskovanje je potekalo v smeri deformacije »zig-zag« strukture, za katero je značilna višja interakcijska energija (13.28 kcal/mol), kar je vodilo k višji vrednosti mehanskih parametrov E in H .

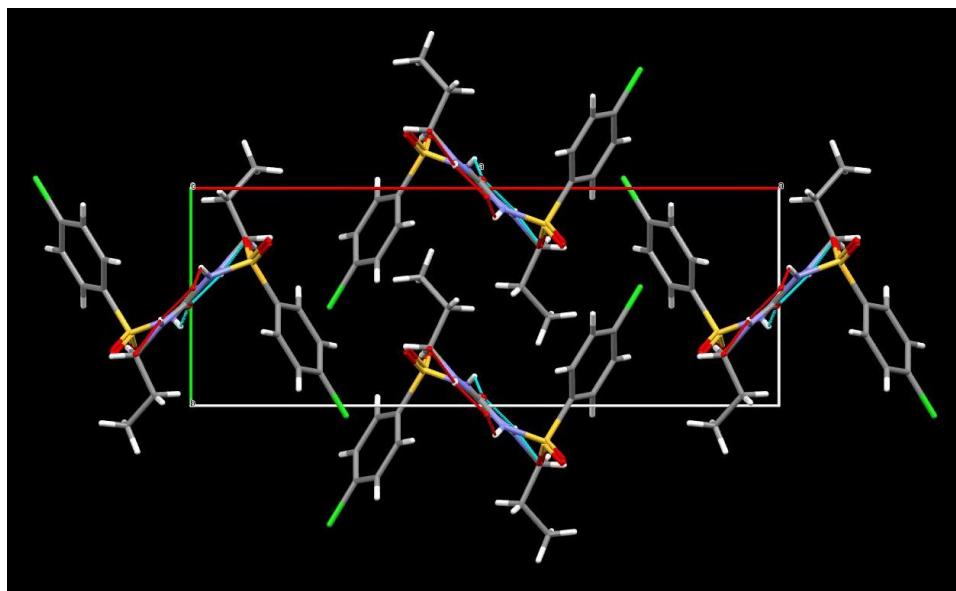
5.2.2.4 Klorpropamid δ

Vodikove vezi so v klorpropamidu δ orientirane vzdolž kristalografske osi c . Parameter b označuje razdaljo med sosednimi trakovi vodikovih vezi. Molekule znotraj trakov vodikovih vezi so nasprotno orientirane in so raztegnjene v smeri a . Dominantna kristalna ploskev odgovarja ravni ab , ki je normalna na položaj vodikovih vezi. Raven ac ustreza manjši kristalni ploskvi (010).

Vtiskovanje dominantne kristalne ploskve (001) omogoča deformacijo v smeri vodikovih vezi (smer drsnih ravnin). Za dosego plastične deformacije v smeri drsnih ravnin potrebujemo najmanj energije. Iz tega razloga je H klorpropamida δ najnižji, v primerjavi z ostalimi polimorfnimi oblikami klorpropamida, ki imajo ortorombski kristalni sistem.



Slika 35: Vodikove vezi v kristalni strukturi klorpropamida δ vzdolž osi b (rdeča črt: os a , modra: os c)
(Raziskovalna skupina prof. E. Boldyreva, neobjavljeni rezultati)



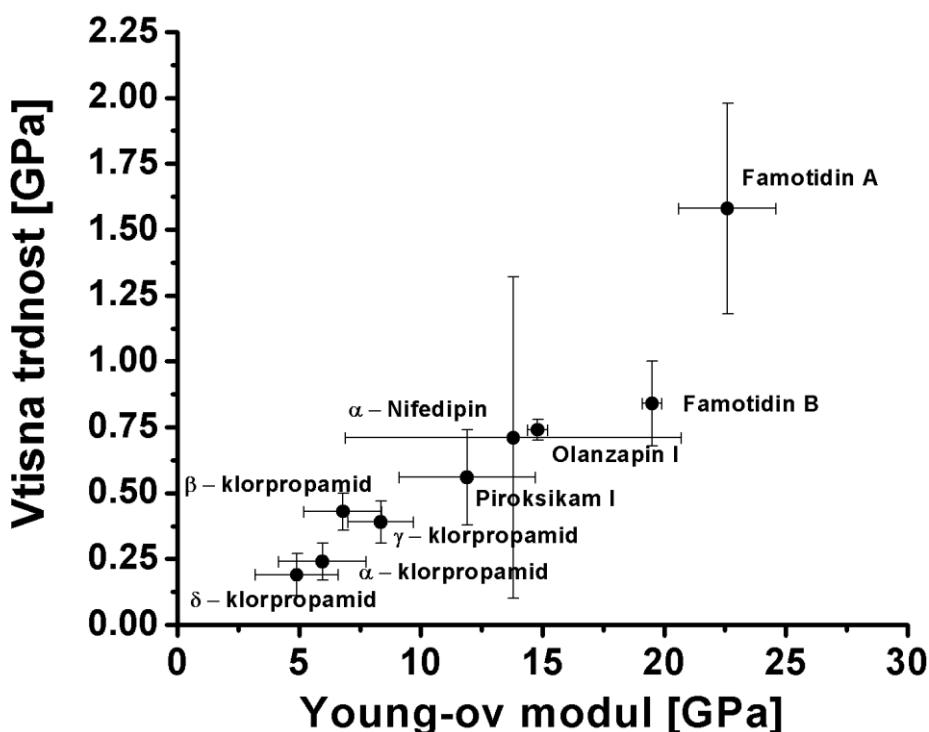
Slika 36: Ureditev molekul (tip Z) v kristalni strukturi klorpropamida δ vzdolž osi c (rdeča črta: os a, zelena črta: os b) (Raziskovalna skupina prof. E. Boldyрева, neobjavljeni rezultati)

5.2.3 Primerjava mehanskih lastnosti polimorfnih oblik klorpropamida z drugimi zdravilnimi učinkovinami

Vrednosti mehanskih parametrov P_y , E/P_y , H/P_y , E in H polimorfnih oblik klorpropamida, smo primerjali z vrednostmi mehanskih parametrov drugih zdravilnih učinkovin iz literature (14).

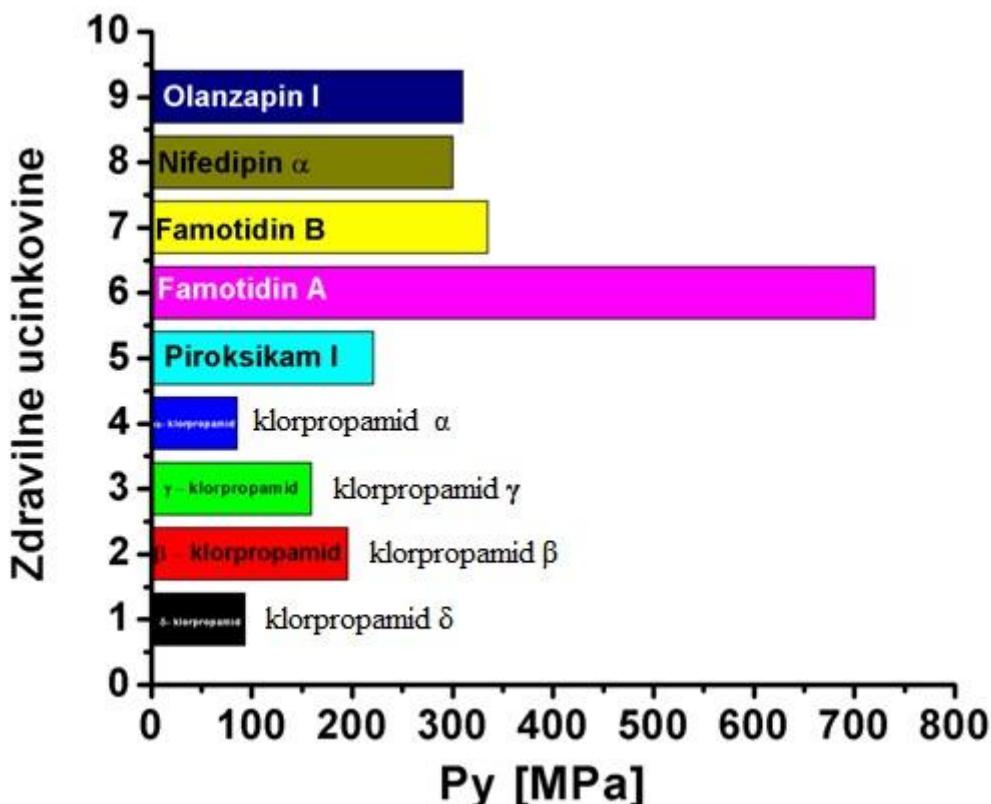
Preglednica VI: Mehanski parametri P_y , E/P_y in H/P_y za zdravilne učinkovine Piroksikam I, Famotidin A, Famotidin B, Nifedipin α in Olanzapin I

Parametri	Piroksikam I	Famotidin A	Famotidin B	Nifedipin α	Olanzapin I
P_y [MPa]	221 ± 68	720 ± 37	335	300	310 ± 0.5
E/P_y	59,3	29,6	60,4	60,4	45,2
H/P_y	2,5	2,1	2,5	2,5	2,4
Način deformacije	krhek/elastičen	krhek	krhek/elastičen	krhek/elastičen	krhek/elastičen



Slika 37: Primerjava izmerjenih vrednosti H in E polimorfnih oblik klorpropamida – α , β , γ in δ , piroksikama, famotidina, nifedipina in olanzapina

Na sliki 37 lahko opazimo pozitiven trend meritev H in E . Materiali, ki imajo nižjo vrednost E izkazujejo tudi nižjo vrednost H . Kljub temu ne moremo zaključiti, da vsi materiali na splošno izkazujejo tako odvisnost. Iz grafa lahko opazimo, da polimorfi klorpropamida izkazujejo višjo plastičnost v primerjavi z drugimi zdravilnimi učinkovinami.



Slika 38: Primerjava P_y različnih zdravilnih učinkovin

Polimorfi klorpropamida imajo primerjalno nižjo vrednost P_y , kar pomeni da prehod elastične deformacije v plastično poteče pri nižjih obremenitvah, kakor pri primerjavnih zdravilnih učinkovinah. Klorpropamid α ima najnižjo vrednost P_y in najvišji razmerji E/P_y ter H/P_y , tudi v primerjavi z drugimi zdravilnimi učinkovinami. Klorpropamid α torej izkazuje največji delež plastične deformacije. Zaradi te lastnosti ima potencialno najbolj primerne mehanske lastnosti pri izdelavi tablet. Tudi na tržišču so tablete s klorpropamidom izdelane iz polimorfne oblike α (22).

Zaradi plastične deformacije se stična površina delcev poveča, kar je predpogoj za povezovanje sosednih delcev ob procesu tabletiranja. Na tak način material tvori koherentne tablete, ki tudi tekom nadalnjih proizvodnih postopkov ter transporta ne razpokajo. Elastična deformacija pri stiskanju delcev ni zaželena, saj po prenehanju delovanja sile povzroči relaksacijo (nastanek kapic in razslojevanje). Vezi se pretrgajo in tablete so ali manj trdne, se hitreje poškodujejo ali pa se sploh ne dajo izdelati (15).

6 SKLEP

Z meritvami na DSC smo uspeli identificirati polimorfne oblike klorpropamida. Iz vrednosti entalpij sklepamo, da je klorpropamid α najstabilnejša polimorfna oblika klorpropamida, kar potrjujejo tudi druge študije (22).

Iz rezultatov instrumentalne nanoindentacije lahko zaključimo, da ima polimorfizem klorpropamida vpliv na njihove mehanske lastnosti. Mehanski parametri, s katerimi smo vrednotili deformacijske lastnosti so bili *Young-ov modul (E)*, *vtisna trdnost (H)*, *meja plastičnosti* ter njihova razmerja. Odziv pri deformaciji, ki smo ga na kristalih klorpropamida določili s tehniko kontinuiranega merjenja togosti, se je razlikoval med posameznimi polimorfnimi oblikami. To kaže na to, da so se pod obremenitvijo polimorfi klorpropamida odzvali različno, zaradi razlik v ureditvi kristalne strukture (molekulska pakiranje).

Največji delež plastične deformacije v času obremenitve kaže klorpropamid α in bi zato s stališča izdelave tablet bil najprimernejši. Pomenljivo je, da so tudi na tržišču tablete s klorpropamidom polimorfne oblike α (22).

Vrednosti mehanskih parametrov polimorfnih oblik klorpropamida (α , β , γ in δ) smo primerjali z zdravilnimi učinkovinami: piroksikam I, famotidin A, famotidin B, nifedipin α in olanzapin I ter ugotovili, da polimorfi klorpropamida izkazujejo večjo nagnjenost k plastični deformaciji.

Vrednosti izmerjenih mehanskih parametrov smo povezali z strukturo polimorfnih oblik klorpropamida. Nizke vrednosti E , H in P_y pri klorpropamidu α razložimo z nizko interakcijsko energijo deformirane ploskve v procesu vtiskovanja na dominantni kristalni ploskvi. V primerjavi s klorpropamidom α je stiskanje dominantne ploskve klorpropamida β (zaradi višje interakcijske energije) vodilo k višji vrednosti mehanskih parametrov E in H . Vtiskovanje v smeri, kjer ni drsnih ravnin je potekalo pri klorpropamidu γ , kar ima za posledico nižjo plastičnost. V smeri kjer ni drsnih ravnin je struktura gostejša in je zaradi »zig-zag« ureditve premik kristalnih ravnin otežen, kar vodi v višji E in H . Nizko vrednost H (večjo plastičnost) pri klorpropamidu δ lahko pojasnimo z vtiskovanjem v smeri

vodikovih vezi, ki je tudi smer drsnih ravnin. Drsna ravnina ima najnižjo interakcijsko energijo, kar pri klorpropamidu δ vodi v nižjo vrednost H in E .

7 LITERATURA

1. Mullin JW: Crystallization. Butterworth-Heinemann Ltd., Oxford 1992
2. Planinšek O, Vrečer F: Izbrana poglavja iz načrtovanja lastnosti delcev, Fakulteta za farmacijo, Ljubljana, 2011:9-69.
3. Mitra PK: Characterization of Materials. Eastern Economy Edition, Delhi 2014:7.
4. Elektronski vir slike: http://sl.wikipedia.org/wiki/Millerjevi_indeksi (dostopno: 05.02.2015)
5. Ivić U: Optimizacija procesnih pogojev farmacevtske učinkovine, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Maribor, 2011:3-6.
6. Chernov AA: Modern crystallography, Vol. III, Crystal growth. Springer-Verlag, Berlin 1984.
7. Carstensen JT: Advanced Pharmaceutical Solids, Drugs and the pharmaceutical sciences, Vol 10, Marcel Dekker, Inc., New York, 2001:117-120.
8. Grand DJW: Theory and origin of polymorphism, Polymorphism in Pharmaceutical Solids, Vol. 95, Marcel Dekker, New York, 1999;1-33.
9. Kovačič B, Planinšek O, Vrečer F: Kokristali zdravilnih učinkovin. Farm Vestn 2010; 61: 30-36.
10. Govendarica B, Ilić I, Šibanc R, Dreu R, Srčić S: The use of single particle mechanical properties for predicting the compressibility of pharmaceutical materials. Powder Technol 2012;225:43-51.
11. Govendarica B: Vrednotenje površinskih in mehanskih lastnosti farmacevtskih surovin in izdelkov na nivoju delcev z uporabo mikroskopije na atomsko silo. Doktorska disertacija, Ljubljana, 2011:17-35.
12. Elektronski vir slike: http://sl.wikipedia.org/wiki/Hookov_zakon (dostopno: 05.02.2015)

13. Elektronski vir slike: <http://www.doitpoms.ac.uk/tplib/BD6/yield.php> (dostopno: 05.02.2015)
14. Egart M: Vrednotenje strukturno-mehanskih lastnosti zdravilnih učinkovin z instrumentalno nanoindentacijo ter njihov pomen pri izdelavi tablet. Doktorska disertacija, Ljubljana, 2014:7-11.
15. Bandyopadhyay R, Grant DJW: Plasticity and Slip System of Plate-Shaped Crystals of L-Lysine Monohydrochloride Dihydrate. *Pharm Res* 2002;19(4):491-496.
16. Oliver WC, Pharr GM: Measurement of hardness and elastic modulus by instrumented indentation. Advances in understanding and refinements to methodology. *J Mater Res* 2011;19(01):3–20.
17. Li X, Bhushan B: A review of nanoindentation continuous stiffness measurement technique and its applications. *Mater Charact* 2002;48:11-36.
18. Egart M, Janković B, Lah N, Ilić I, Srčič S: Nanomechanical properties of selected single pharmaceutical crystals as a predictor of their bulk behaviour. *Pharm Res* 2015;32(2):469-81.
19. Agilent Technologies G200 Nano Indenter, User's Guide; 2009:26
20. Rang HP, Dale MM, Ritter JM, Flower RJ: Rang and Dale's Pharmacology, 6th Ed, 2007, Churchill Livingstone Elsevier, London:405.
21. Ayala AP, Caetano MWC, Honorato SB, Mendes Filho J, Siesler HW, Faudone SN, Cuffini SL, Martins FT, da Silva CCP: Conformational polymorphism of the antidiabetic drug chlorpropamide. *J Raman spectrosc* 2012;43:263-272.
22. Drebushchak VA, Drebushchak TN, Chukanov NV, Boldyreva EV: Transitions among five polymorphs of chlorpropamide near the melting point. *J Therm Anal Calorim*. 2008;93:343-351.
23. Drebushchak TN, Chukanov NV, Boldyreva EV: Two polymorphs of chlorpropamide: the δ -form and the high-temperature ϵ -form. *Acta Crystallogr., Sect. C: Cryst. Struct. Commun.* 2008;C64:o623-o625.

24. Šernek M, Ugovšek A: Visokotlačni diferenčni dinamični kalorimeter – HP DSC 1. LesWood 2012;64:34-35.
25. Elektronski vir slike:
<http://www.people.vcu.edu/~crtaylor/Nanolab%20Web%20Page/Nanotechnology.htm> (dostopno: 05.02.2015)
26. Oliver WC, Pharr GM: Measurement of hardness and elastic modulus by instrumented indentation: Advances in understanding and refinements to methodology. J Mater Res 2004;19(1).
27. Roberts RJ, Rowe RC: The compaction of pharmaceutical and other model materials – a pragmatic approach. Chem Eng Sci 1987;42(4):903-911.