



UNIVERZITET U NOVOM SADU  
PRIRODNO-MATEMATIČKI  
FAKULTET  
DEPARTMAN ZA FIZIKU



# Uticaj temperature na strukturu klopidogrel bisulfata u praškastim uzorcima

- master rad -

Mentor: doc. Dr Maja Stojanović  
Čubrilo

Kandidat: Jasmina

Novi Sad, 2012.

# SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
2. TEORIJSKI DEO.....	3
2.1. Difrakcija.....	3
2.1.1. Priroda i dobijanje rendgenskog zračenja.....	3
2.1.2. Difrakcione metode.....	6
2.1.2.1. Debaj – Šererova metoda.....	8
2.1.2.2. Difraktometar za polikristalne uzorke.....	10
2.1.2.3. Difraktometrijsko ispitivanje strukturnih promena pri različitim temperaturama	13
2.2. Polarizaciona mikroskopija.....	13
2.2.1. Ortoskopsko posmatranje.....	16
2.2.2. Konoskopsko posmatranje.....	17
2.3. Polimorfizam kristala.....	17
2.3.1. Termodinamička teorija polimorfizma.....	19
2.3.2. Polimorfizam u farmaciji.....	22
2.3.3. Primena klopidogrel bisulfata i njegova polimorfna stanja.....	23
3. CILJ RADA.....	28
4. EKSPERIMENTALNI DEO.....	29
4.1. Eksperimentalna aparatura.....	29
4.1.1. Eksperimentalna aparatura za difrakciju i difraktometrijsko ispitivanje strukturnih promena pri različitim temperaturama.....	29
4.1.2. Eksperimentalna aparatura za polarizacionu mikroskopiju.....	31
4.2. Tok eksperimenta.....	31
4.2.1. Difraktometrijsko isipitivanje strukturnih promena pri različitim temperaturama.....	31
4.2.2. Polarizaciona mikroskopija.....	32
5. REZULTATI I DISKUSIJA.....	33
5.1. Difraktometrijska ispitivanja.....	33
5.2. Polarizaciona mikroskopija.....	40
6. ZAKLJUČAK.....	41
7. LITERATURA.....	42

# 1. UVOD

Poznato je da se čvrsta kristalna supstanca može javiti u različitim formama:

- u formi monokristala, skoro idealno hemijski čistog, kristalne individue su preko 0,1mm i aproksimativno možemo smatrati da je periodičnost očuvana u celom uzorku

- u formi polikristala koji je sačinjen od mnogobrojnih različito orijentisanih kristalića unutar kojih se nezavisno održava periodičnost; kristalna zrna su međusobno mehanički povezana

- u formi kristalnog praha, skup kristalnih zrna koja nisu mehanički povezana

U zavisnosti od tipa uzorka koji imamo i informacija koje želimo da dobijemo, postoji širok spektar eksperimentalnih metoda.

Ukoliko je uzorak u formi monokristala, moguće je izračunati parametre kristalne rešetke – koordinate atoma u elementarnoj ćeliji, međuravanska rastojanja i uglove među njima, odrediti simetriju i prostorne grupe kristala. Eksperimentalne metode koje se mogu primeniti na ovakvim uzorcima su: metoda Lauea (*Max Theodor Felix von Laue*), oscilatorna, Vajsenbergova (*K. Weissenberg*), precesiona metoda i difraktometrija monokristala.

Ukoliko je uzorak u formi polikristala ili kristalnog praha, moguće je izvršiti kvalitativnu analizu uzorka (identifikovati prisutne faze), odrediti parametre jedinične ćelije, veličine kristalita, napone u rešetki; moguće je izvesti i kvantitativnu analizu ili pratiti fazne transformacije. Svaka kristalna supstanca daje karakterističnu difrakcionu sliku na osnovu koje je moguća njena identifikacija. Eksperimentalne metode koje se mogu primeniti na ovakvim uzorcima su: Debaj – Šererova metoda (*P. Debye, P. Scherrer*) i difraktometarska metoda za polikristalne uzorke.

metoda	forma uzorka	inicijalno x-zračenje	način detekcije difraktovanog zračenja
metoda Laua	monokristal	polihromatsko	filmska tehnika
oscilatorna metoda		monohromatsko	filmska tehnika
Vajsenbergova metoda		monohromatsko	filmska tehnika
precesiona metoda		monohromatsko	filmska tehnika
difraktometrija monokristala		monohromatsko	brojačka tehnika
Debaj - Šererova metoda	prah	monohromatsko	filmska tehnika
difraktometrija polikristala		monohromatsko	brojačka tehnika

Tabela 1. Metode rendgenske struktурне analize

Problemi koji se javljaju pri difrakciji na uzorcima u formi monokristala su nedovoljno kvalitetni uzorci, nemogućnost dobijanja uzorka adekvatnih dimenzija i činjenica da je neke supstance nemoguće sintetisati u ovoj formi. U formi polikristala ili kristalnog praha svi kristali se mogu uspešno preparirati; problem sa uzorcima koji su u formi monokristala se lako prevaziđa jednostavnim mrvljenjem. Stoga, prirodno se nametnula potreba za

usavršavanjem metoda difrakcije na polikristalnim i uzorcima u formi kristalnog praha. Ove metode registruju difraktovano zračenje brojačkim, odnosno detektorskim metodama, što inicira i razvoj i poznavanje kompjuterskih programa za obradu eksperimentalnih podataka.

U zavisnosti od režima rada polarizacionog mikroskopa, moguće je posmatrati i odrediti različite karakteristike kristala: oblik i veličinu zrna, postojanje pukotina, cepljivost, reljef, psudoapsorpciju, boju, polihroizam, interferentne boje, moguće je razlikovati optički izotropne od optički anizotropnih materijala, optički jednoosne od optički dvoosnih kristala, optički pozitivne od optički negativnih, kao i određivanje ugla optičkih osa. Sve ovo je moguće posmatrati na različitim temperaturama.

Kako je tema ovog rada "Uticaj temperature na strukturu klopidogrel bisulfata u praškastim uzorcima", u prvom, teorijskom delu, detaljnije će biti obrađene teme difrakcije, difrakcionih metoda na polikristalima i prahu, difraktometrijskog ispitivanja strukturnih promena pri različitim temperaturama, polarizacione mikroskopije, polimorfizma generalno i polimorfizma klopidogrel bisulfata i njegove primene u farmaciji.

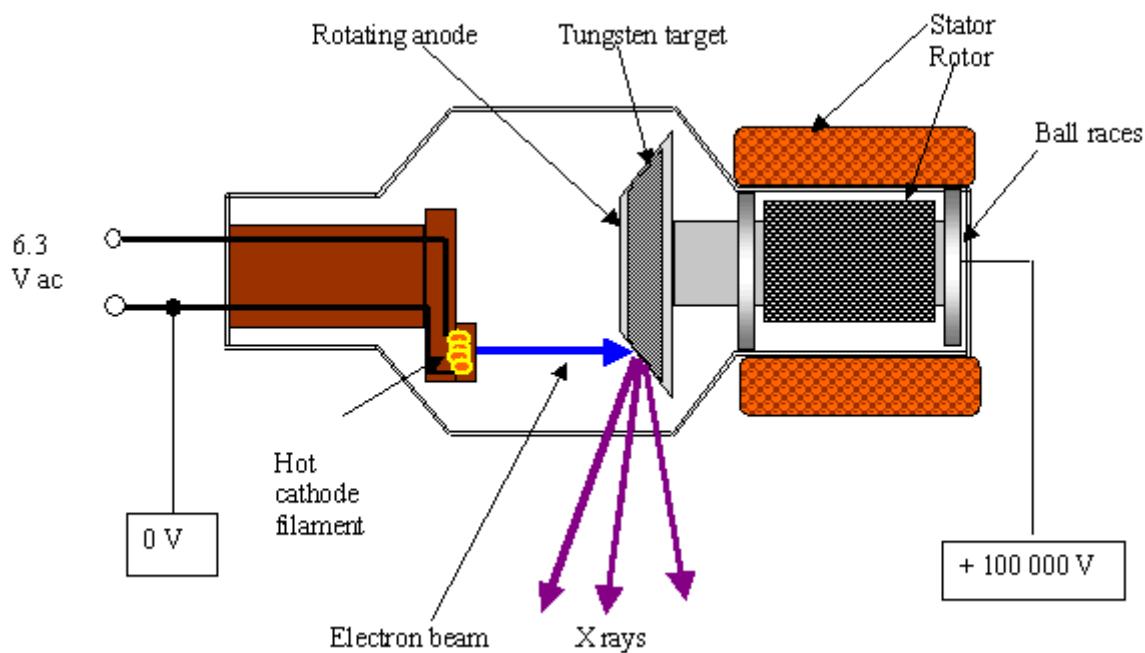
## 2. TEORIJSKI DEO

### 2.1. Difrakcija

#### 2.1.1. Priroda i dobijanje rendgenskog zračenja

Uslovi difrakcije elektromagnetskog zračenja na kristalnoj rešetki su odgovarajuća talasna dužina primjenjenog zračenja i dovoljna prodorna moć da bi se obezbedio intenzitet difrakcionih snopova koji omogućava detekciju i odgovarajuća merenja. Oba uslova ispunjavaju rendgenski zraci, snopovi neutrona odgovarajuće energije i elektroni odgovarajućih brzina koji su ređe u upotrebi jer su potrebnii odgovarajući uređaji koji generišu snopove ovih čestica. Neutroni se koriste za detekciju efekata na lakiim atomima, a x - zraci za istraživanja na težim atomima. Ipak, u praksi je najčešće korišćenje x - zraka u raznim eksperimentalnim metodama.

V. K. Rendgen (*Röntgen*) je 1895. godine tokom proučavanja električnog pražnjenja kroz razređene gasove otkrio zrake novog tipa. On im je i dao naziv x - zraci, a danas se često nazivaju rendgenski zraci. Tokom narednih nekoliko godina, Rendgen je ispitivao njihove osobine: ionizacionu moć, fluorescenciju koju izazivaju na pojedinim materijalima, apsorpciju na materiji, eksponiranje fotografiskih ploča itd. Rendgen je uspeo da pokaže da x - zraci ne skreću u električnom i magnetnom polju, što je dokaz da nisu nanelektrisane čestice. x - zraci su elektromagnetne talasne prirode, malih talasnih dužina od 0,01 – 10nm, i u spektru elektromagnetnih talasa se nalaze između ultraljubičastog i  $\gamma$  – zračenja.



Slika 1. Rendgenska cev [4]

x – zraci se dobijaju u rendgenskim cevima (slika 1.). Snop elektrona se kreće od užarene katode konkavnog oblika (u cilju fokusiranja snopa), ubrzava se korišćenjem radnog napona (reda veličine bar KV) ka anodi, sudara se sa njom i usled usporenja nanelektrisanih čestica dolazi do emisije elektromagnetskog zračenja. Tokom radnog režima rendgenskih cevi

neophodno je stalno hlađenje vodom, jer se veliki deo energije elektrona gubi na toplotu, svega 1% energije snopa elektrona se pretvara u energiju x – zračenja. Materijali od kojih su napravljene anode mogu biti različiti; najčešće se koriste Volfram, Molibden, Gvožđe, Nikl, Kobalt itd. jer ovi materijali imaju visoke tačke topljenja.

Kinetička energija jednog elektrona koji stiže do površine anode je:

$$E = e \cdot U \quad (2.1.)$$

gde je:

$e$  – naelektrisanje elektrona – približno  $1,602 \cdot 10^{-19} \text{ C}$

$U$  – napon između elektroda u cevi

Ako se pri jednom sudaru elektrona sa atomom anode celokupna energija elektrona transformiše u energiju jednog fotona x - zraka, onda će to biti foton sa maksimalnom energijom, maksimalnom frekvencijom a minimalnom talasnom dužinom:

$$E = e \cdot U = h \cdot v_{\max} = \frac{h \cdot c}{\lambda_{\min}} \quad (2.2.)$$

gde je:

$h$  – Plankova (*Planck*) konstanta – približno  $6,63 \cdot 10^{-34} \text{ J} \cdot \text{s}$

$v_{\max}$  – maksimalna frekvencija ovog fotona [ $\text{s}^{-1}$ ]

$c$  – brzina svetlosti u vakuumu – približno  $3 \cdot 10^8 \frac{\text{m}}{\text{s}}$

$\lambda_{\min}$  – minimalna talasna dužina ovog fotona [m]

Iz jednačine 2.2. jednostavno je odrediti  $\lambda_{\min}$ , odnosno kratkotalasnu granicu spektra. Kada uvrstimo u 2.2. vrednosti poznatih konstanti, dobijamo Duan – Hantovu (*W. Duane, F. L. Hunt*) jednačinu, koja odgovara ovom ekstremnom slučaju kada je kompletan dostignuta energija elektrona pretvorena u energiju fotona x – zraka:

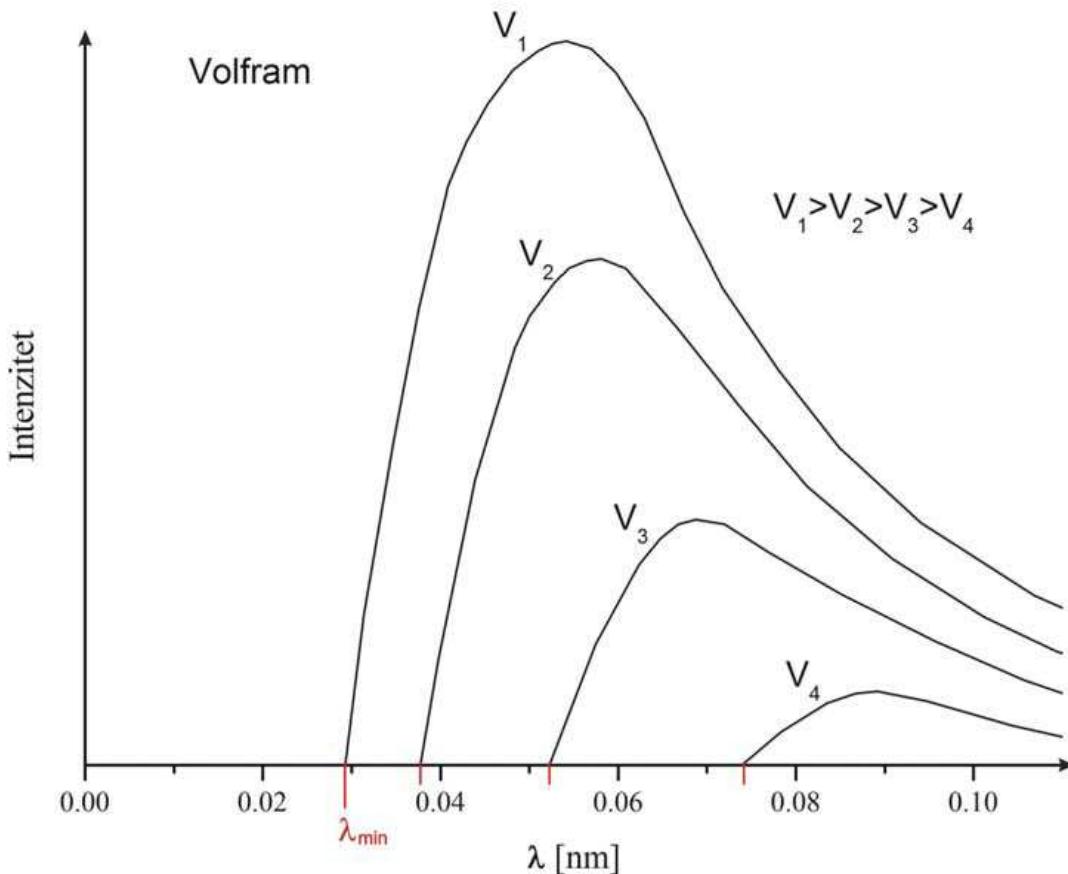
$$\lambda_{\min} = \frac{12,37}{U} \quad (2.3.)$$

gde se talasna dužina dobija u angstromima ( $1 \text{ \AA} = 10^{-10} \text{ m}$ ) ukoliko se napon  $U$  uzme u kV.

Elektroni često ne izgube svu svoju kinetičku energiju pri jednom sudaru sa atomom anode već pri seriji sudara, pri čemu se svaki deo energije koji elektron izgubi tokom jednog sudara pretvara u energiju fotona x – zračenja i na ovaj način se dobijaju foton različite energije, odnosno talasne dužine i frekvencije. Ovo zakočno zračenje čini kontinualni spektar sa izraženom kratkotalasnom granicom. Kao što se vidi iz jednačine 2.3. kratkotalasna granica kontinualnog spektra ne zavisi od materijala od kojeg je napravljena anoda rendgenske cevi, već samo od primjenjenog radnog napona. Položaj maksimuma intenziteta u ovakovom spektru takođe zavisi samo od napona  $U$ ; za vrednost talasne dužine koja odgovara maksimumu intenziteta u spektru empirijski je dobijena sledeća relacija:

$$\lambda_{\max} = \frac{3}{2} \lambda_{\min} + 0,005 \quad [\text{nm}] \quad (2.4.)$$

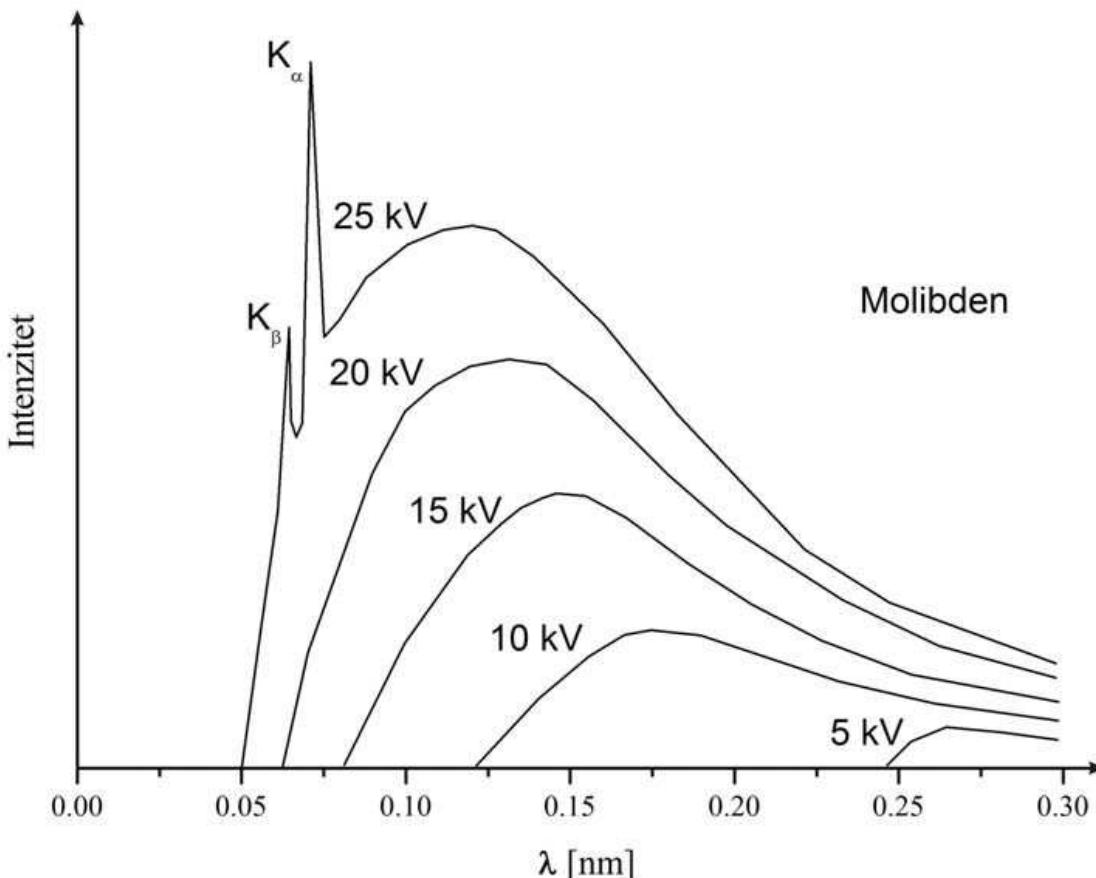
Na slici 2. predstavljen je kontinualni spektar Volframa za različite vrednosti napona.



Slika 2. Kontinualni spektar Volframa za različite vrednosti napona [3]

Ako upotrebljeni radni napon pređe određenu kritičnu vrednost (tzv. eksitacioni potencijal – karakteristična vrednost za metal od kojeg je napravljena anoda), na kontinualnom spektru će se javiti oštri pikovi na određenim talasnim dužinama. Položaji ovih pikova zavise od materijala od kojeg je napravljena anoda i nazivaju se karakterističnim x – zracima i formiraju karakteristični linijski spektar. Linijski spektar je uvek superponiran na kontinualni. Elektroni putem sudara predaju energiju atomima anode; ukoliko je predata energija dovoljno velika, moguća je ionizacija njenih atoma, odnosno izbacivanje ne samo elektrona iz spoljašnjih ljudskih već i iz unutrašnjih. Kako tada postoje upražnjena mesta na nižim nivoima, dolazi do prelaza elektrona sa viših nivoa na niže. Elektroni pri tom gube energiju u vidu x – zračenja, i upravo ovo zračenje daje karakterističan linijski spektar; svaki pik ovakvog spektra odgovara određenom prelazu koji se izvršio u atomu anode. Ovi pikovi se obeležavaju sa K, L, M itd. u zavisnosti od toga između kojih ljudski nastaje prelaz elektrona u atomima anode. Prilikom prelaska elektrona sa L na K ljudsku, emituje se  $K_{\alpha}$  zračenje, a prelaskom sa M na K nastaje  $K_{\beta}$  zračenje itd. Moguća je pojava i fine strukture na linijskom spektru, odnosno pojava dubleta, koja je posledica cepanja nivoa sa kojeg elektron vrši prelaz.

Na slici 3. prikazan je karakteristični spektar Molibdena za različite vrednosti napona.



Slika 3. Karakteristični spektar Molibdена za različite vrednosti primjenjenog napona [3]

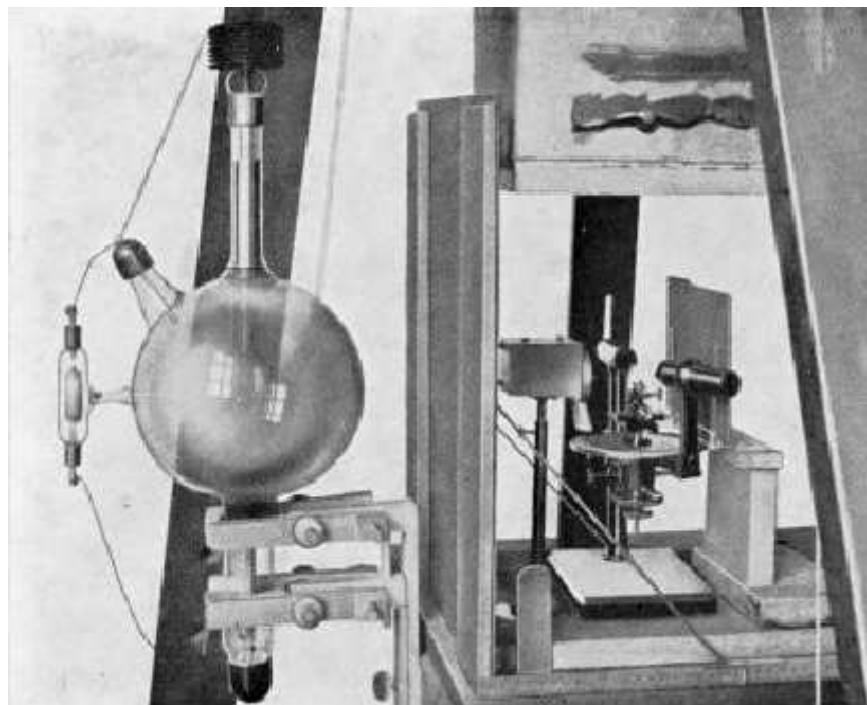
Najveći broj metoda rendgenske difrakcije zahteva upotrebu monohromatskog inicijalnog zračenja, što zahteva rešenje dva problema. Prvi je eliminisanje ili smanjenje uticaja kontinualnog dela spektra x – zraka. Pokazalo se da je najpovoljniji odnos između intenziteta linija karakterističnog zračenja i kontinualnog dela spektra kada se koristi radni napon rendgenske cevi koji je četiri puta veći od eksitacionog potencijala. Drugi problem je izdvajanje određene linije iz linijskog spektra, najčešće izdvajanje  $K_{\alpha}$  linije. Ovaj problem se može rešiti korišćenjem specijalnih metalnih filtera koji vrše selektivnu atenuaciju na tačno određenim talasnim dužinama (linearni apsorpcioni koeficijent zavisi od talasne dužine). Drugi metod rešenja ovog problema jeste upotreba monokristala sa visokom difrakcionom moći (najčešće kvarc) koji se stavlja na put nefiltriranog x – zračenju. Moguće je proračunati pod kojim uglom od poznate kristalografske ravni će se difraktovati  $K_{\alpha}$  linija koja će se kasnije koristiti. Ovaj postupak je moguće ponoviti više puta, dok se ne dostigne željeni stepen monohromatičnosti zraka, ali mora se imati u vidu da se većim brojem ponavljanja smanjuje intenzitet željenog zračenja.

## 2. 1. 2. Difrakcione metode

Do naglog razvoja kristalografske nauke, došlo je početkom XX veka zaslugom Maksa Lauea (*Max von Laue*), mladog, ali već tada poznatog naučnika sa izraženim osećajem za optičke pojave. X – zraci su već bili otkriveni, kao i njihova elektromagnetska priroda i vrednosti talasnih dužina od 0,01 – 10 nm, i smatralo se da su konstante kristalnih rešetki reda

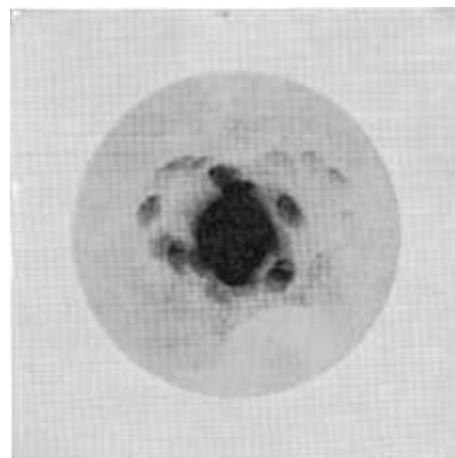
veličine  $10^{-10}$  m. Laue je, polazeći od toga da vidljiva svetlost difrakcije na optičkoj rešetki reda veličine talasne dužine tog elektromagnetnog zračenja, zaključio da bi na kristalnoj rešetki trebalo očekivati pozitivnu interferenciju primenom rendgenskih zraka.

Fridrih (*I. V. Friedrich*) i Kniping (*P. Kniping*) su eksperimentalno potvrdili Laueovu pretpostavku. Na slici 4. predstavljena je aparatura koju su koristili.



*Slika 4. Fridrihova i Knipingova aparatura[5]*

Kristal bakar sulfata proizvoljne orijentacije postavili su na put x – zracima iz visokonaponske cevi, a difraktovano zračenje su detektovali fotografskom pločom. Pored upadljivog traga direktnog snopa, na ploči su uočili i pravilne tačke jasno skrenute sa pravolinijske putanje. Na slici 5. prikazana je ova difrakciona slika.



*Slika 5. Fridrihova i Knipingova prva difrakciona slika [5]*

Ovo je bio prvi eksperiment interferencije elektromagnetskog zračenja na kristalnoj rešetki, za koji je Laue 1914. godine dobio Nobelovu nagradu.

Nakon ovog, usledio je ubrzani razvoj kristalografije kao nauke, a posebno difrakcionih metoda.

S obzirom na to da će se eksperimentalni deo ovog diplomskog rada odnositi na rad na difraktometru za polikristale i kristalni prah, zadržaćemo se samo na metodama difracije na ovakvim uzorcima.

Metodama difracije na polikristalima i prahu možemo utvrditi koje su kristalne faze prisutne u konkretnom uzorku, i ukoliko faza ima više i sve su kristalne, ove metode omogućuju i kvantitativna merenja, odnosno utvrđivanje zastupljenosti svake faze. Međuravanska rastojanja sa raspodelom intenziteta su specifična karakteristika svakog kristala što omogućuje njegovu identifikaciju. Svaki kristal koji se pojavi u preliminarnim ispitivanjima bilo gde u svetu, dobija svoje mesto u internacionalnim bazama podataka. Izdvajaju se dve metode: Debaj - Šererova metoda i difraktometarska metoda za polikristalne uzorke.

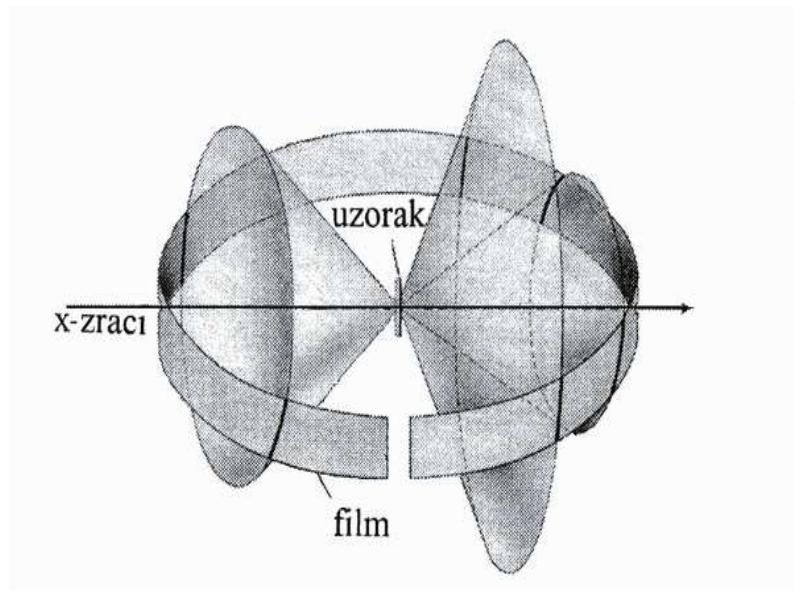
### *2. 1. 2. 1. Debaj – Šererova metoda*

Karakteristike Debaj – Šererove metode su:

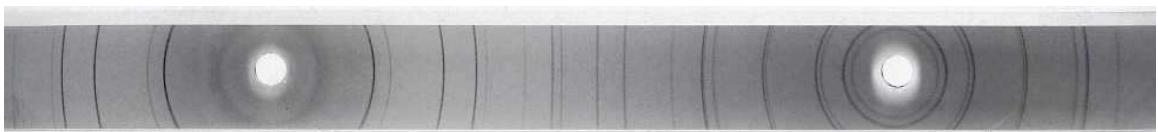
- monohromatsko inicijalno zračenje
- nepokretna cilindrična filmska kamera kao detektor
- polikristalni uzorak koji se obrće

Za realizaciju ove metode potrebna je relativno mala količina materijala za preparaciju uzorka. Uzorak se sprašuje, što je moguće sitnije, i prah se stavlja u Lindemanovu kapilaru (prečnika 0,2 do 0,3 mm). Ovako pripremljen preparat se sastoji od kristalnih zrna potpuno haotične orijentacije. Polikristalne uzorke moguće je i direktno formirati u obliku valjka i pričvrstiti na nosač. Tokom merenja, preparat rotira oko ose normalne na pravac upadnog zračenja. Ovo se najviše radi u cilju povećanja homogenosti difrakcionih linija na snimku, mada je statistički raspored kristalnih zrna u polikristalima takav da i bez obrtanja uzorka obezbeđuje položaj svih kristalografskih ravni pod odgovarajućim Bragovim uglom kako bi se realizovala difracija.

Na slici 6. dat je šematski prikaz Debaj – Šererove metode, a na slici 7. je prikaz filma nakon izvršene difracije.



Slika 6. Šematski prikaz Debaj – Šererove metode [1]



Slika 7. Film nakon difrakcije po Debaj – Šererovoj metodi [6]

U zavisnosti od karakteristika korišćene eksperimentalne aparature i karakteristika uzorka, vreme eksponiranja je od nekoliko desetina minuta pa sve do nekoliko časova. Prekratko vreme eksponiranja ne pruža dovoljno jasne informacije o prisustvu linija slabijeg intenziteta, dok predugo vreme eksponiranja znatno pojačava fon, izaziva zacrnjenje duž celog filma i utiče na detekciju linija i određivanje intenziteta.

Cilindrična kamera je male visine. Sa njene unutrašnje strane postavlja se film koji ima dva kružna otvora, jedan za ulaz kolimatora x – zračenja, a drugi za antikolimatorski zastor koji apsorbuje nedifraktovani deo zračenja kako bi sprečio pojavu crne mrlje na snimku, koja može da utiče na detekciju linija koje su posledica difrakcije pod malim uglovima.

Za određivanje relevantnih međuravanskih rastojanja, potrebno je utvrditi tačnu korelaciju između obima kamere i dimenzija filma. Standardne kamere koje se koriste su obima 180mm ili 240mm, ali prilikom postavljanja filma u kameru, i tokom njegovog razvijanja i sušenja dolazi do izvesnih odstupanja, najčešće skupljanja filma. Kolimator i antikolimator su uvek pod uglom od  $180^\circ$  (dve svetle tačke na slici 7. su probušena mesta filma na koja naležu kolimator i antikolimator) i siguran su reper koji obezbeđuje jednostavnu korekciju odnosno utvrđivanje tačne korelacije između rastojanja sa snimka i uglova difrakcije, korišćenjem jednostavne proporcije:

$$180^\circ : AB = \theta : X \quad (2.5.)$$

Kada na taj način odredimo ugao  $\theta$ , upotrebom poznate Bragove (Bragg) relacije, jednostavno se može odrediti međuravansko rastojanje:

$$n \cdot \lambda = 2d \cdot \sin \theta \quad (2.6.)$$

Određivanje vrednosti intenziteta linija koje će se koristiti za normiranje i utvrđivanje međusobnih odnosa intenziteta difrakcije za pojedine ravni je složenije. Grubo se vizuelno može proceniti, a preciznije fotometrijskim metodama i računskom obradom.

Ova metoda zahteva veliki napor i iskustvo u identifikaciji materijala. Komplikacije se javljaju usled prisustva više komponenti u jednom uzorku, a njihov broj može da se kreće i na desetine hiljada. Zato su neophodne i druge informacije koje mogu suziti broj mogućih kristalnih oblika za kojima se traga.

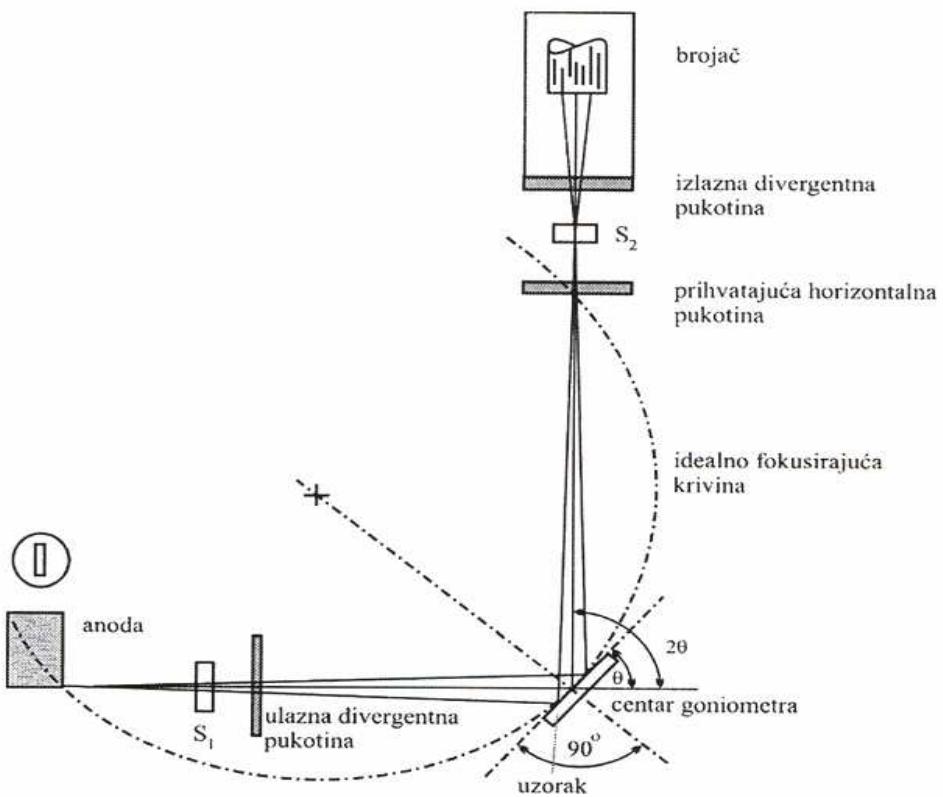
### 2. 1. 2. 2. Difraktometar za polikristalne uzorke

Osnovne karakteristike ove metode su:

- monohromatsko inicijalno zračenje
- polikristalni uzorak koji se obrće
- scintilacioni brojač kao detektor koji se sinhrono obrće sa obrtanjem uzorka

Difraktometar za polikristalne uzorke se razlikuje od prethodno opisane metode po tome što je detektor efekta difrakcije osetljivi scintilacioni brojač. Fotoni rasejanih x - zraka izazivaju ionizaciju preko koje je moguće precizno merenje svih intenziteta. Osim scintilacionog brojača, moguća je upotreba i raznih drugih, no scintilacioni su i dalje najviše u upotrebi zahvaljujući svojoj dugotrajnosti, lakom rukovanju, a i ceni. Rezultati se prezentuju u digitalnoj formi, odmah se obrađuju na željeni način, ili se preko pisača automatski prikazuje i prati spektar rasejanja u željenom uglovnom intervalu.

Za realizaciju ove metode potrebna je relativno velika količina materijala za preparaciju uzorka, jer je neophodno obezbediti da meta bude dovoljne veličine kako bi snop upadnog zračenja difraktovao na svim uglovima. Polikristalni uzorak se formira u pravougaoni oblik reda veličine centimetra i debljine milimetra i montira na držač uzorka. Kristalni prah se presuje u tabletu ili meša sa pogodnim amorfnim nosačem kako bi postigao neophodnu mehaničku čvrstoću. Pri ovom postupku, važno je обратити posebnu pažnju na izbegavanje tendencije praškastih delića ka preferentnoj orientaciji jer osnovna prepostavka metode jeste idealno haotičan raspored. Takođe je bitno, ako se uzorak preparira u nosaču, obezbediti da površina bude homogena i glatka.

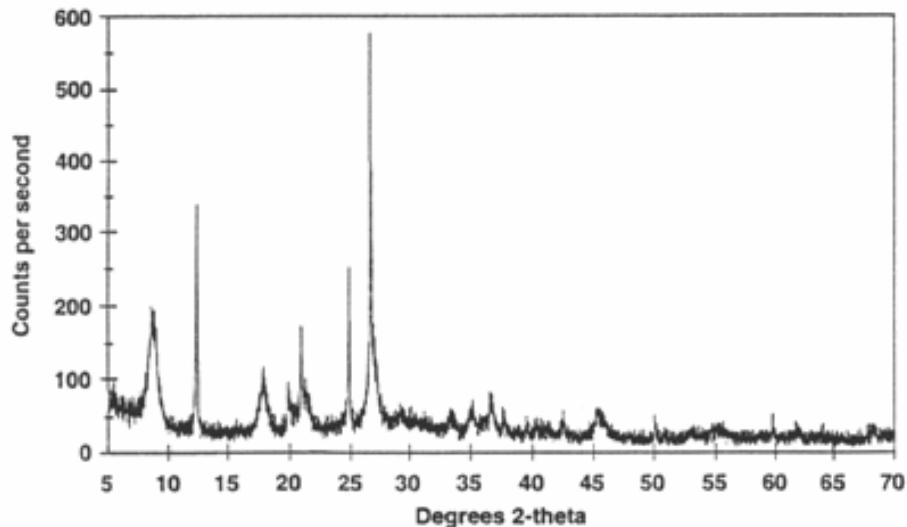


Slika 8. Šematski prikaz difraktometra za polikristalne uzorke [1]

Na slici 8. dat je šematski prikaz difraktometra za polikristalne uzorke. Inicijalni snop x – zraka je monohromatizovan apsorpcionim filterima ili monokristalnim monohromatorima. Sistemom pukotina – pukotine Solera (*Soller*) snop se kolimiše ka uzorku koji je na nosaču. Nosač može da rotira oko ose normalne na pravac upadnog snopa. Detektorski krug skeniranja je u vertikalnoj ravni.

Iz osnovnih postavki Bragovog modela difrakcije, jasno je da ako je uzorak postavljen pod upadnim uglom  $\theta$ , aktuelno je merenje na dvostruko većem ugлу  $2\theta$  u odnosu na inicijalni zrak. Zato je neophodno da se prilikom skeniranja obezbedi sinhronizacija pri kojoj obrtanje uzorka prati obrtanje brojača za dvostruko veći ugao, poznato kao  $\theta - 2\theta$  geometrija. Moguća je i  $\theta - \theta$  geometrija, koja je redje u upotrebi, pri kojoj je neophodno simultano rotiranje rendgenske cevi i detektora za istu vrednost ugla, dok uzorak miruje.

Za određivanje relevantnih međuravanskih rastojanja, potrebno je tačno određivanje ugla difrakcije sa horizontalne ose ovakvih difraktograma, što se odabiranjem odgovarajućih brzina obrtanja uzorka i brojača i brzina pomeranja papira pisača može učiniti sa visokim stepenom tačnosti. Iz izmerenih vrednosti uglova difrakcije, međuravanska rastojanja se računaju na osnovu Bragove formule (2. 6.), kao i kod Debaj - Šererove filmske metode. Na slici 9. je prikazan difraktogram za jedan polikristalni uzorak.



*Slika 9. Difraktogram za jedan polikristalni uzorak [8]*

Dijagram praha se sastoji od niza pikova različitog položaja i intenziteta. Položaj pika se definiše uglom  $2\theta$  i zavisi od talasne dužine upotrebljenog rendgenskog zračenja. Kod upotrebe većih talasnih dužina rastojanja između pikova su veća, a kod upotrebe manjih talasnih dužina, pikovi će biti bliži jedan drugom bez obzira što se radi o istom uzorku. Vrednosti za međuravanska rastojanja ( $d$ ) računaju se, kako je već rečeno, pomoću Bragove formule (2. 6.).

Intenziteti difrakcije sa svake kristalografske ravni linearne su proporcionalni površinama ispod krivih koje na snimku odgovaraju pojedinim pikovima. Na osnovu vrednosti ovih površina mogu se direktno vršiti normiranja i određivati međusobni odnosi intenziteta difrakcije. Sa porastom koncentracije neke komponente raste i površina odgovarajućih difrakcionih pikova. Čak i relativno visoka tačnost određivanja intenziteta daje samo mogućnost procene kvantitativnog učešća pojedinih komponenti u sastavu složenog kristalnog uzorka; i vrlo precizno realizovan postupak pruža samo procenu sadržaja sa greškom koja je reda veličine celog procenta. Pri tome je neophodno raspolagati sa odgovarajućim standardima i sačiniti eksperimentalne kalibracione krive.

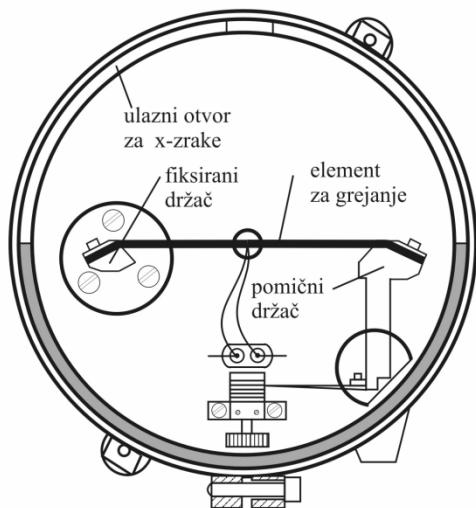
Današnji difraktometri za prah uglavnom su automatizovani, što znači da se svim ovim operacijama upravlja pomoću računara, odnosno kompjuterskih programa. Sve funkcije difraktometra kontroliše mikroprocesor. Sakupljeni podaci se mogu prikazati grafički na ekranu računara, što omogućava njihovu brzu proveru i dalju analizu. Sa pojavom automatizovanih difraktometara za prah sada je moguće podatke koji su dostupni na računaru analizirati u velikom broju različitih tehnika.

Karakteristika difrakcije na polikristalima i prahu je smanjenje recipročnog 3D prostora kristala na jednodimenzionalnu  $2\theta$  osu, a rezultujući efekti su:

- sistematsko preklapanje difrakcionih pikova zbog simetrijskih uslova
- slučajno preklapanje zbog ograničenja eksperimentalne rezolucije
- poteškoće pri određivanju fona

## 2. 1. 2. 3. Difraktometrijsko ispitivanje strukturalnih promena na različitim temperaturama

Difraktometarske metode omogućuju i ispitivanje strukturalnih promena pri različitim temperaturama. Za potrebe ovakvih ispitivanja, koristi se dodatak prethodno opisanom difraktometru za polikristalne uzorke, u vidu temperaturne komore. Šematski prikaz visoko temperaturne komore difraktometra za polikristalne uzorke, dat je na slici 10.



Slika 10. Šematski prikaz temperaturne komore difraktometra za polikristalne uzorke [1]

Komora se postavlja na mesto držača uzorka (slika 9.). Držač uzorka je platinska ili tantalska šipka. Pritisak vazduha u komori je moguće regulisati, kao i temperaturu. Moguće je zagrevati uzorak određenom brzinom ili termostatirati uzorak na željenoj temperaturi.

Ova metoda ne zahteva veće količine uzorka, a postupak merenja je identičan kao kod difraktometra za polikristalne uzorke na sobnoj temperaturi.

## 2. 2. Polarizaciona mikroskopija

Svetlost predstavlja elektromagnetični talas, ravnost oscilovanja električnog i magnetnog polja su međusobno normalne i normalne su na pravac prostiranja talasa. Kod bele svetlosti, smer oscilacija se idealno nepravilno menja, tako da su svi smerovi oscilovanja podjednako zastupljeni, kao što je prikazano na slici 11.a). Polarizovana svetlost podrazumeva postojanje "povlašćenih" pravaca oscilovanja. Kod linearно polarizovane svetlosti oscilacije se odvijaju samo u jednom pravcu, u ravni koja je normalna na pravac oscilovanja. Projekcija oscilacija linearno polarizovane svetlosti je prava. Projekcija linearno polarizovane svetlosti je prikazana na slici 11.b).

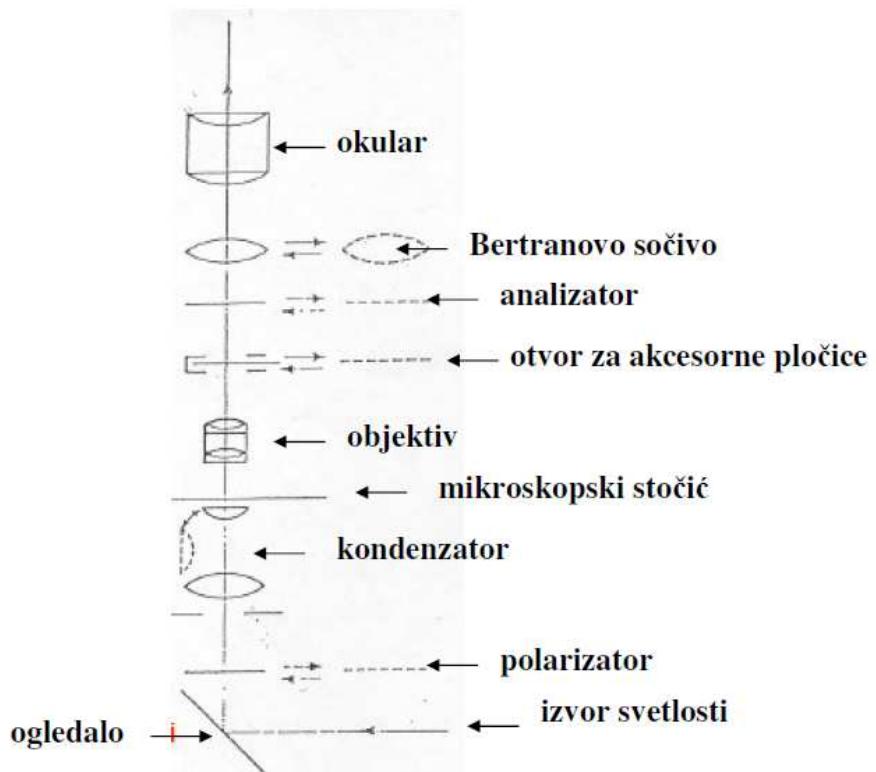


Slika 11. a)vibracije nepolarizovane svetlosti b) vibracije lineaarno polarizovane svetlosti [24]

Linearno polarizovana svetlost se praktično može dobiti refleksijom sa površine staklene ploče ili pomoću optičkih prizmi koje su napravljene od materijala koji pokazuju osobinu dvojnog prelamanja, odnosno razlažu svetlost na dva linearno polarizovana talasa – Nikolove prizme. Razlikuju se ordinarni talas (redovni) i ekstraordinaran (neredovni). Ordinarni talas se ponaša prema Fresnelovom zakonu, nastavlja kretanje pravo i osciluje normalno na pravac prostiranja i normalno na optičku osu. Ekstraordinarni talas osciluje normalno na ordinarni talas, u ravni koja sadrži ordinarni talas i optičku osu.

Kristali se na osnovu optičkih osobina mogu podeliti na optički izotropne i optički anizotropne. Kod optički izotropnih materijala svetlost se u svim pravcima prostire istom brzinom (jedan indeks prelamanja). Kod anizotropnih materijala, dolazi do pojave dvoloma, odnosno do pojave razdvajanja incidentnog zraka na dva. Oni mogu biti optički jednoosni ili dvoosni, prema broju optičkih osa. Optički jednoosni kristali kristališu tetragonalno, heksagonalno i trigonalno, a dvoosni ortorombično, monoklinično i triklinično. Kristali koji kristališu u kubnoj strukturi su optički izotropni. Kod optički jednoosnih materijala dvojno prelamanje je moguće u svim pravcima osim kada se svetlost prostire duž kristalografske ose. Odnosno postoji jedan pravac duž kojeg je moguće prostiranje svetlosti a da ne dođe do pojave dvojnog prelamanja, i to je optička osa. Dakle, jednoosni kristali imaju jednu optičku osu, a dvoosni dve. Ordinarni zrak uvek osciluje normalno na optičku osu, prostire se istom brzinom i ima isti indeks prelamanja.

Polarizacioni mikroskop koristi polarizovanu svetlost. Njegovi delovi shematski su predstavljeni na slici 12. Polarizacioni mikroskop ima u osnovi sve elemente standardnog mikroskopa, uz dopunske delove, od kojih su najbitniji: polarizator, analizator i Bertranovo sočivo



Slika 12. Shematski prikaz polarizacionog mikroskopa [24]

Polarizacioni mikroskop je konstruisan tako da obezbedi posmatranje uzorka zahvaljujući njihovom optičkom anizotropnom karakteru. Kako bi ovo bilo moguće, obavezni delovi polarizacionog mikroskopa su polarizator i analizator. Polarizator se nalazi na putu svetlosnog snopa ispod posmatranog uzorka, a analizator na optičkom putu između uzorka i objektiva. Ova dva dela polarizacionog mikroskopa obezbeđuju linearnu polarizaciju svetlosti. Mogu se obrnati oko vertikalne ose mikroskopa, mogu menjati ugao ravni polarizacije i time se mogu dovesti u međusobno paralelan ili ukršten položaj. Kontrast slike potiče od interakcije ravanski polarizovane svetlosti i uzorka koji uzrokuje nastajanje dve talasne komponente, polarizovane u međusobno normalnim ravnima. Brzine ovih komponenti (ordinarne i ekstraordinarne) su različite. Nakon prolaska kroz uzorak, svetlosne komponente nisu u fazi, a do rekonstrukcije dolazi usled konstruktivne ili destruktivne interreferencije koja se odvija u analizatoru.

Bertranovo sočivo se nalazi ispred analizatora i njegovim uvođenjem na optički put omogućuje se posmatranje interferencijalnih slika na uzorku.

Uzorci se najčešće posmatraju u propuštenoj svetlosti. U slučajevima kada to nije ostvarljivo, koriste se dodatni delovi koji omogućuju osvetljavanje i posmatranje uzorka iz pravca iznad predmetnog stočića (refleksiona metoda rada).

Polarizacioni mikroskop omogućava ortoskopsko i konoskopsko posmatranje, u zavisnosti od toga koje karakteristike kristala su od interesa.

### 2.2.1. Ortoskopsko posmatranje

Kod ortoskopskog posmatranja uzorak se osvetjava snopom paralelne upadne svetlosti. Finalna posmatranja se realizuju uz ukrštene polaroide za ugao od  $\pi/2$  i uz isključeno Bertranovo sočivo.

Ortoskopsko posmatranje, kada je na optički put uključen samo polarizator, omogućava određivanje: oblika i veličine zrna, pukotine, cepljivost, reljef, pseudoapsorpciju, boju, polihroizam. Kada se na optički put postavi i analizator, moguće je razlikovanje optički izotropnih i anizotropnih materijala, posmatranje interferentnih boja, pomračenja, optički karakter izduženja, zonarnost, bližnjenje.

Za merenje veličine pojedinačnih zrna koristi se okular-mikrometar, odnosno okular sa skalom. Okular-mikrometar je neophodno kalibrirati sa objekt-mikrometrom, kako bi se dobila veličina jednog podeoka na okular-mikrometru. Nakon što se izmeri veličina uzorka u broju podeoka okular-mikrometra, veličina zrna se dobija jednostavnim množenjem.

Reljef kristala zavisi od razlike u indeksima prelamanja kristala i njegove okoline (kanada balzama). Ako razlike nema, kaže se da kristal nema reljef i da se njegove granice u preparatu ne vide. Na osnovu razlike u indeksima prelamanja, reljef može biti nizak, umeren i visok. Može biti pozitivan i negativan, u zavisnosti od toga da li je indeks prelamanja uzorka manji ili veći od indeksa prelamanja okoline.

Kod anizotropnih kristala, treba posmatrati reljef za svaki od razdvajanjem nastalih talasa (položaj pomračenja). Ukoliko se dva talasa izrazito razlikuju po indeksu prelamanja, a jedan od njih je jako blizak vrednosti indeksa prelamanja kanada balzama, u jednom položaju će reljef biti nizak a u drugom izražen, pa će granice zrna i pukotine biti izraženije, odnosno, mineral će izgledati tamnije kao da je deo svetla apsorbovan. Ova pojava naziva se pseudoapsorpcija.

Boja kristala posledica je selektivne apsorpcije. Kod anizotropnih kristala može a i ne mora biti različita za različite oscilatorne smerove. Polihroizam je pojava promene boje kristala za različite oscilatorne smerove. Posmatra se boja za svaki razdvajanjem nastao talas (položaj pomračenja). Polihroični jednoosni kristali imaju maksimalno dve boje, a polihroični dvoosni maksimalno tri boje.

Optički izotropni materijali sa ukrštenim nikolima su tamni i ostaju tamni okretanjem mikroskopskog stočića. Anizotropni materijali mogu pokazati isti ovaj efekat ukoliko je presek koji posmatramo normalan na optičku osu. Tada se mogu razlikovati samo na osnovu konoskopskog merenja.

Interferentna boja nastaje interferencijom razdvajanjem nastalih talasa nakon svodenja u ravan analizatora, i posledica je u razlici pređenih puteva ova dva talasa, što je posledica razlike brzina prostiranja ova dva talasa kroz kristal. Interferencijom može doći do potpunog ili delimičnog poništenja ili pojačanja svetlosti. Pri radu sa mikroskopom, koristi se bela svetlost. Usled interreferencije, zavisno do putne razlike, svetlost pojedinih talsanih dužina može biti pojačana, oslabljena ili poništena. Kombinacija svetlosti koja je ostala, rezultuje interferentnom bojom. Interferentna boja zavisi i od debljine prepaprata i od orientacije.

### 2.2.2. Konoskopsko posmatranje

Za konoskopsko posmatranje odabiraju se takvi elementi polarizacionog mikroskopa koji obezbeđuju osvetljavanje uzorka konvergentnim snopom upadne svetlosti. Finalno posmatranje se realizuje uz ukrštene polaroide za ugao od  $\pi/2$  i uz uključeno Bertranovo sočivo i aktuelni su samo uzorci za koje je utvrđena optička aktivnost. Ovaj vid posmatranja omogućava razlikovanje optičkih izotropnih od anizotropnih materijala, razlikovanje optički jednoosnih i dvoosnih kristala, razlikovanje optički pozitivnih i negativnih kristala i određivanje ugla optičke ose.

Ovakva posmatranja karakterišu tzv. konoskopske figure, koje su posledica dvostrukе interferencije. Upadljiva tačka na konoskopskoj figuri je melatopa koja odgovara prođoru optičke ose. Tamno polje u obliku krsta koje se uočava, predstavlja izogire čiji su kraci orijentisani u pravcu polaroida. Usled razlike geometrijskih puteva zraka koji su bliži melatopi i onih koji su udaljeniji od te tačke, javlja se efekat interferencije bele svetlosti i formiranje slike spektralnih boja. Kod kristala, ovaj efekat je dodatno složeniji usled uticaja brzine svetlosti u pojedinim pravcima na razliku optičkih puteva.

Kod jednoosnih kristala konoskopske figure imaju oblik kružnica za interferencione prstenove. Kod dvoosnih kristala, konoskopska figura se deformiše u formu elipse. Uzorci se proizvoljno postavljaju na predmetno staklo, tako da svojom optičkom osom uvek zaklapaju neki ugao sa osom konusa upadne svetlosti. Iz ovog razloga, efekat interferencije se uočava uvek kao deo kružnice ili deo elipse, bez obzira na karakter posmatranog kristala.

Pri određivanju znaka kristala, koristi se kvarcni klin (akcesorna pločica) koji se postavlja u mikroskop pod uglom od  $45^\circ$  u odnosu na polarizator i analizator. On omogućuje određivanje znaka kristala na osnovu praćenja kretanja interferencionih linija. Kristali mogu biti optički pozitivni ili negativni u zavisnosti od odnosa brzina redovnog i neredovnog znaka.

Polarizacionim mikroskopom mogu se pratiti fazne promene, uz dodatne delove mikroskopa koji omogućuju kontrolisano zagrevanje posmatranog uzorka, tako da je omogućena primena ove metode na različitim temperaturama. Ovo je našlo posebnu primenu kod ispitivanja mezofaze nekih tečnih kristala.

## 2. 3. Polimorfizam kristala

Polimorfizam (grč. *poli* - više, *morphe* - oblik) je sposobnost supstancije da kristališe u više od jedne kristalne strukture, najčešće usled različitih uslova kristalizacije. Polimorfizam se sreće kod svih oblika kristalnog stanja, uključujući i polimere, metale i minerale. Ova pojava je vrlo značajna u oblastima farmacije, agrohemije, prehrane, eksploziva itd.

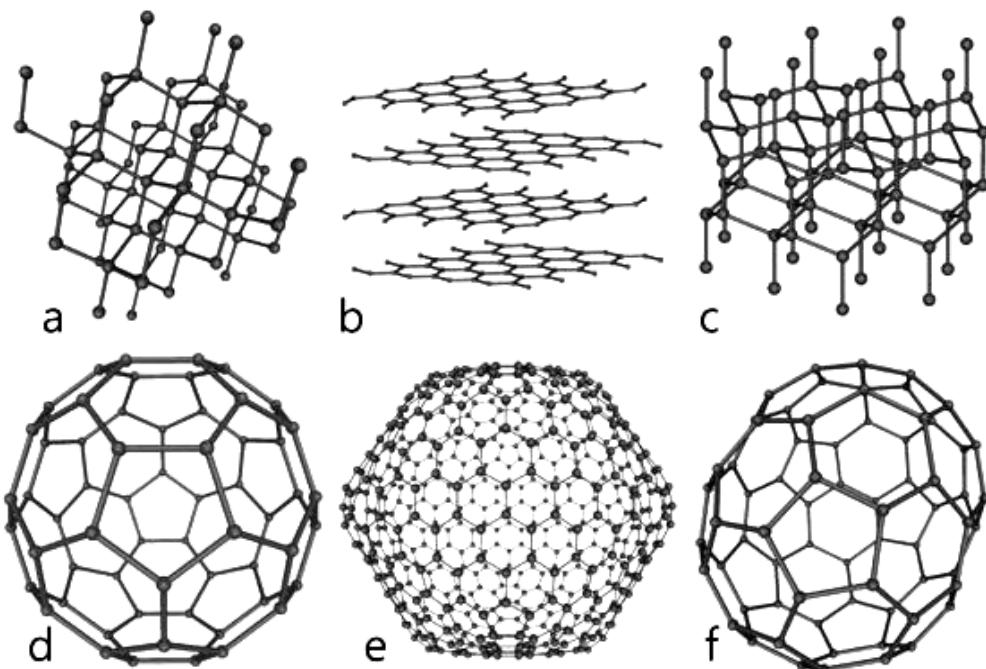
Kristalizacija je proces nastajanja uređenog čvrstog stanja supstancije iz nekog drugog stanja koje nije takvo, pod dejstvom privlačnih kohezionih sila. Proses kristalizacije se može odigrati u prirodnom okruženju kada se stvore povoljni uslovi, ali postoji i značajan broj industrijskih i laboratorijskih metoda za dobijanje kristalnih formi. Kristalizacija je spontana nakon ostvarivanja neophodnih uslova. Sistem teži da zauzme minimum potencijalne energije, stoga on prvo mora biti doveden u labilno stanje sa karakteristikama prezasićenja; stabilno stanje ovakvog sistema postiže se kristalizacijom odnosno izdvajanjem čvrste faze.

Ako kristal sa okolinom posmatramo kao sistem, njegov odgovarajući fazni dijagram će nam pokazati kako treba uticati na pojedine parametre da bismo ostvarili pomeranje u željenom pravcu. Okolinu mogu činiti isti konstituenti, ali oni moraju biti u stanju koje nije

čvrsto: rastop, rastvor, para ili gas. Hemijski potencijal okoline je  $\mu_0$ , a hemijski potencijal konstituenata u čvrstoj fazi je  $\mu_s$ . U slučaju kada konstituenti imaju istu vrednost potencijalne energije, u sistemu neće doći do promene i sistem je u ravnoteži. Ako je  $\mu_s \neq \mu_0$  nastaju promene. Proces kristalizacije nastaje u slučaju kada je  $\mu_s < \mu_0$ , u suprotnom, spontano započinje proces dekristalizacije.

Kristalizacija zavisi kako od spoljašnjih parametara (pritisak, zapremina, temperatura) tako i od unutrašnjih (osobine prisutnih atoma). Kristal predstavlja stanje sa najnižom potencijalnom energijom za dati sistem i date uslove. Stoga, ovo je vrlo stabilan sistem, koji uz odgovarajuće stabilne spoljašnje parametre neće menjati svoju uređenost. Ukoliko dođe do promene spoljašnjih uslova, moguće je preuređenje kristalnog stanja u novo kristalno stanje sa još nižom potencijalnom energijom. Tada uočavamo već pomenutu pojavu da isti konstituenti mogu ostvariti više modifikacija koje se mogu bitno razlikovati po svojim fizičkim osobinama, odnosno uočavamo polimorfni prelaz ili polimorfnu transformaciju - prelaz iz jedne u drugu modifikaciju. Polimorfne modifikacije se obeležavaju grčkim slovima; modifikacija koja je stabilna pri normalnoj i nižoj temperaturi obeležava se sa  $\alpha$ , a ostale modifikacije pri višim temperaturama slovima  $\beta$ ,  $\gamma$  itd.

Tipičan primer polimorfizma je polimorfizam Kalaja. Na temperaturama nižim od  $13,2^{\circ}\text{C}$  on ima dijamantsku kristalnu strukturu  $\alpha\text{-Sn}$ . Na temperaturi  $13,2^{\circ}\text{C}$ ,  $\alpha\text{-Sn}$  prelazi u  $\beta\text{-Sn}$  koji ima tetragonalnu kristalnu rešetku. Pri daljem zagrevanju, na temperaturi od  $161^{\circ}\text{C}$ ,  $\beta\text{-Sn}$  prelazi u rombičnu modifikaciju  $\gamma\text{-Sn}$ . Polimorfizam se javlja i kod mnogih drugih hemijskih elemenata - Ugljenika, Gvožđa, Nikla, Bora, Kobalta, Volframa itd. Dijamant i grafit su najpoznatije modifikacije ugljenika i savršen su primer koliko se fizička i hemijska svojstva različitih modifikacija mogu međusobno razlikovati. Danas se zahvaljujući tehnologiji visokih pritisaka, dijamant može uspešno dobiti iz grafta. Na slici 13. prikazane su neke od ugljenikovih modifikacija.



Slika 13. Alotropske modifikacije ugljenika: a – dijamant; b – grafit; c – lonsdalit; d, e, f – fuleren [14]

## 2. 3. 1. Termodinamička teorija polimorfizma

Razmatraćemo dve polimorfne modifikacije (A i B) molekulskog kristala pri konstantnom pritisku. Modifikacija A je stabilnija na temperaturi 0 K, i  $\Delta X = X_B - X_A$  za bilo koju termodinamičku promenljivu veličinu X.

Na prvoj mogućoj tački prelaza ( $T_p$ ), u slučaju enantiotropizma (reverzibilna transformacija kristala između dve različite forme pri promeni temperature), uslov ravnoteže ukazuje da su molarne slobodne energije (slobodne entalpije) jednake na temperaturi prelaza  $T_p$ , pa je razlika entalpija data sledećim izrazom:

$$\Delta H = \Delta G + T_p \Delta S = 0 - T_p \left( -\frac{\partial \Delta G}{\partial T} \right) > 0 \quad (2.7.)$$

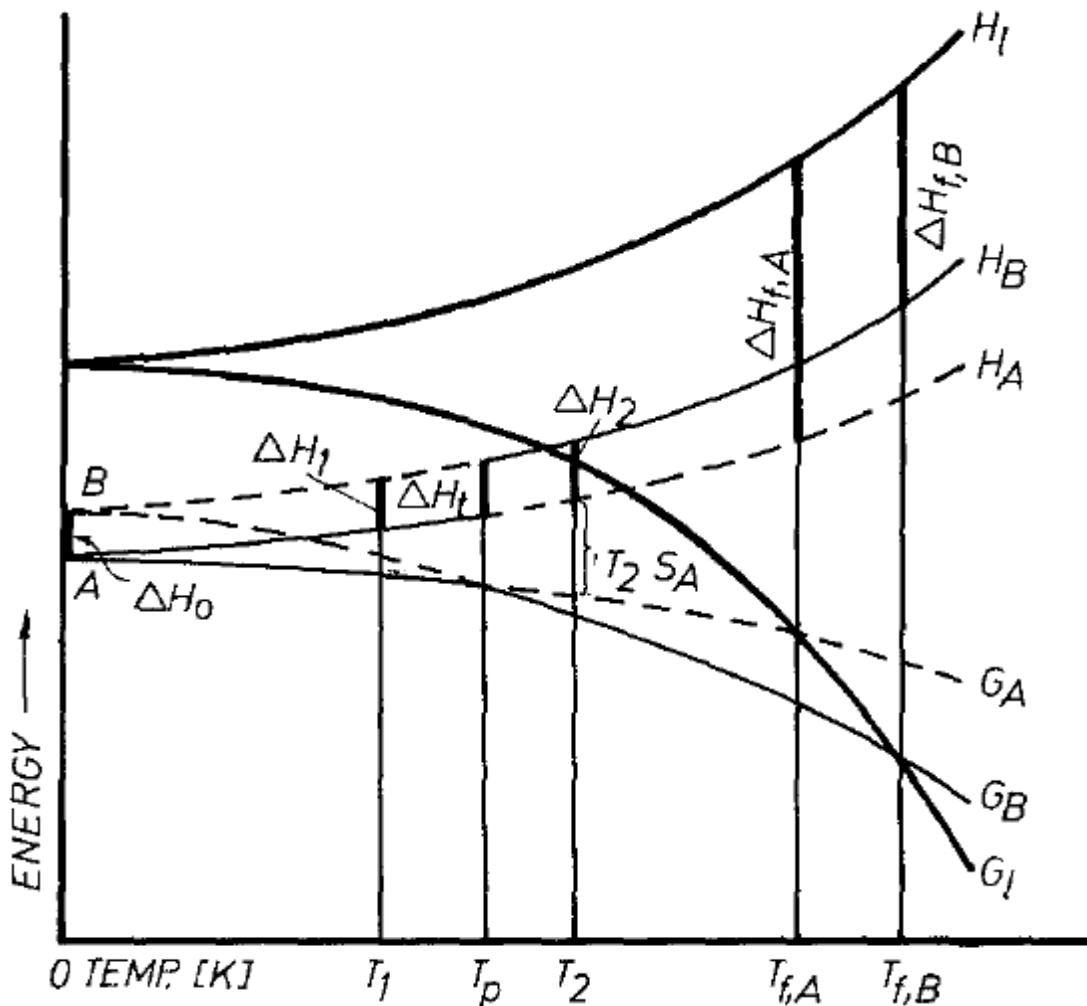
gde je:

-  $H$  – entalpija (toplotni sadržaj sistema pri konstantnom pritisku)

-  $S$  – entropija (mera neuređenosti sistema, količnik količine topote i temperature)

-  $G$  – Gibbsova (*J. W. Gibbs*) slobodna energija (energija oslobođena ili apsorbovana tokom reverzibilnog procesa na konstantnom pritisku i konstantnoj temperaturi)

Kako je  $T_p$  uvek pozitivna veličina,  $\Delta H$  mora imati isti znak kao i  $\Delta S$ , a pošto je  $\Delta S$  pozitivno na  $T_p$  (svaka promena teži povećanju entropije), zaključujemo da su u okolini tačke prvog prelaza mogući samo endotermni prelazi sa tačke niže temperature ka tački više.



Slika 14. [15]

Kako se stvarne temperature prelaza ( $T_1$  i  $T_2$  na slici 14.) ne poklapaju sa temperaturom  $T_p$ , otvara se pitanje da li se prethodno ustanovljeno pravilo na temperaturi  $T_p$  može proširiti na sve temperature u slučaju enantiotropizma i kako se monotropizam (sposobnost supstancije da postoji u više kristalnih formi, ali pri tom postoji samo jedna stabilna modifikacija na svim pritiscima i temperaturama) može uključiti u prethodni zaključak. Da bi ovo pitanje dobilo odgovor, neophodno je posmatrati ponašanje  $\Delta H$  i  $\Delta S$ .

Na temperaturi 0K možemo zanemariti male razlike u vrednostima oscilatornih energija, tako da je  $\Delta H_0$  određeno potencijalnom energijom. Razlike u konformaciji stoga i u odgovarajućoj energiji i entropiji su neznatne u većini polimornih sistema, pa je  $\Delta H_0$  uglavnom određeno karakteristikama rešetke.

U prvoj aproksimaciji, termalno kretanje kristalne rešetke sastoji se od nezavisnih harmonijskih oscilacija, svaka od njih može biti opisana kretanjem u potencijalnom polju. U ovoj aproksimaciji zanemarujemo termičko širenje tako da je specifični molarni topotni kapacitet dat sledećom jednačinom:

$$c_p = c_v = \frac{k}{n} \sum_v \frac{\left(\frac{hv}{kT}\right)^2 \exp\left(\frac{hv}{kT}\right)}{\left[\exp\left(\frac{hv}{kT}\right) - 1\right]^2} \quad (2.8.)$$

gde je:

- $n$  – količina supstance
- $k$  – Boltzmanova (*Boltzmann*) konstanta, približno  $1,38 \cdot 10^{-23} \text{ J}\cdot\text{K}^{-1}$
- $h$  – Plankova (*Planck*) konstanta, približno  $6,626 \cdot 10^{-34} \text{ J}\cdot\text{s}$
- $v$  – frekvencija

Potencijal je određen frekvencijom, a suma svih potencijala daje energiju rešetke. Ako je potencijal niži za jednu od modifikacija, frekvencija će biti veća. Ako prepostavimo da će za sve frekvencije  $v$  važiti da je  $v_A \geq v_B$ , shodno jednačini 2.8. možemo zaključiti da će vrednost  $\Delta c_p$  uvek biti pozitivna. Kako modifikacija A ima nižu vrednost entalpije na temperaturi 0 K, i uz  $\Delta c_p > 0$ , važi:

$$\Delta H = \int_0^T \Delta c_p dT + \Delta H_0 > 0 \quad (2.9.)$$

$$\Delta S = \int_0^T \frac{\Delta c_p}{T} dT + \Delta S_0 > 0 \quad (2.10.)$$

Ako su oba stanja savršeno kristalno uređena,  $\Delta S_0$  će na temperaturi 0 K biti nula.

Za realne kristale, harmonijska aproksimacija nije validna, stoga uslov  $v_A \geq v_B$  ne mora uvek da važi i anharmonijske efekte bi trebalo uzeti u obzir, ali odgovarajuće korekcije će biti minimalne. Takođe, frekvencija zavisi ne samo od dubine potencijalne jame, već i od širine, tako da niži potencijal ne mora da obavezuje i nižu frekvenciju. Uprkos ovim problemima u realnim sistemima, korekcije koje bi trebalo izvršiti su komplikovane, a rezultujuće promene u odnosu na uvedene aproksimacije minimalne, stoga se prihvata da jednačine 2.9. i 2.10. važe i u realnim sistemima.

Kako su  $\Delta S$  i  $\Delta H$  pozitivne veličine, prepostavlja se da se na grafiku prikazanom na slici 14. krive  $H$  međusobno neće presecati, a da se krive  $H$  sa krivama  $G$  presecaju maksimum jednom. Kako su mogući jedino prelazi ka stanjima sa nižom slobodnom energijom, statističko – mehaničkim pristupom potvrđeno je pravilo spomenuto na početku, koje se može formulisati:

Ukoliko je posmatran endotermalni prelaz na određenoj temperaturi, prelaz će biti izvršen u smeru niže temperature, odnosno dve faze su povezane enantiotropizmom. Ukoliko je posmatran egzotermni prelaz na određenoj temperaturi, može biti prepostavljeno da prelaz neće biti izvršen u smeru niže temperature, odnosno dve faze su ili povezane monotropizmom, ili je prelaz usmeren u smeru porasta temperature. Ovo pravilo se naziva pravilom toplotne prelaza (*The Heat – of – Transition Rule – HTR*). Iako za sad postoji nekoliko poznatih izuzetaka, pravilo se može primenjivati sa visokim stepenom pouzdanosti.

Pravilo entalpije topljenja (*The Heat – of – Fusion Rule*): ako oblik sa većom tačkom topljenja ima nižu entalpiju topljenja, ove dve forme uglavnom predstavljaju slučaj enantiotropizma, u suprotnom su slučaj monotropizma. Naravno, razlika u vrednostima entalpija topljenja za dva oblika se može izračunati i nije jednaka toploti prelaza.

Pri poređenju različitih struktura molekulskih kristala ustanovljeno je da u najvećem broju slučajeva, jedini značajan uticaj na vrednost entalpije na temperaturi od 0K ima energija rešetke. U odsustvu orijentacione interakcije preko npr. vodoničnih veza, ova energija najviše zavisi od udaljenosti između površinskih molekula, odnosno preciznije između spoljašnjih atoma susednih molekula. Iz geometrijskih razloga, molekuli se ne mogu dodirivati svuda, odnosno rastojanja između atoma će na nekim mestima biti veća od odgovarajućeg očekivanog minimuma. Minimalna potencijalna energija koja obezbeđuje stabilnu formu na 0K će biti postignuta na dobru aproksimaciju minimiziranjem rastojanja između susednih molekula, odnosno gustim pakovanjem (osim u retkim slučajevima kada konformacija molekula utiče na prednosti gustog pakovanja). Pod pretpostavkom jednostavnih neusmerenih interakcija iste snage na celoj površini, može se reći da je minimiziranje rastojanja ekvivalentno maksimiziranju gustine pakovanja. Ukoliko su prisutne usmerene sile, kao što je vodonična veza, odgovarajući kratki kontakti imaju dominantan uticaj na intermolekularnu potencijalnu energiju. U ovom slučaju nije moguće ustanoviti korelaciju između gustine pakovanja i potencijalne energije, posebno u slučajevima kada se dve različite strukture, svaka sa odgovarajućom lokalnom minimalnom energijom, razlikuju u uređenju ovih kontakata. Nekad je efikasnije optimalno uređenje interakcija vodoničnih veza i veća rastojanja između ostalih molekularnih površina, nego kraća rastojanja svuda. U ovom slučaju, gustina nestabilnih faza može biti znatno veća. U slučaju nedovoljno uređenih kristala, potencijalna energija i makroskopska struktura se dobijaju usrednjavanjem različitih pozicija ili orijentacija. Jasno je da takvi "prosečni molekuli" imaju nižu vezujuću energiju, više su rašireni i imaju otvorenije strukture. Iz ovih postavki može se zaključiti da forme koje su stabilne na temperaturi 0K uglavnom imaju veću gustinu, odnosno može se formulisati pravilo gustine (*Density Rule*): ako jedna modifikacija molekulskog kristala ima manju gustinu od druge, može se pretpostaviti da će ona biti manje stabilna u odnosu na drugu na temperaturiapsolutne nule. Prikupljeni eksperimentalni podaci ukazuju na svega nekoliko poznatih izuzetaka ovog pravila.

Ukoliko postoji više od dve moguće modifikacije, prethodno navedena pravila treba primeniti na svaku moguću kombinaciju dve modifikacije.

### 2. 3. 2. Polimorfizam u farmaciji

Nakon otkrića prvih slučajeva polimorfizma u farmaciji sredinom devedesetih godina prošlog veka, i potvrde o vrlo različitim biološkim aktivnostima dva ili više polimorfnih stanja, utvrđivanje njihovog postojanja, karakteristika i stabilnosti je postala neizbežna faza u farmaceutskim istraživanjima.

Polimorfni oblici mogu imati različite hemijske i fizičke karakteristike kao što su tačka topljenja, hemijska reaktivnost, rastvorljivost, optičke i električne osobine, gustina itd. Ove osobine imaju direktni uticaj na kvalitet, bioaktivnost i stabilnost leka stoga je neophodno detaljno ih proučiti za svako njegovo moguće polimorfno stanje. U tu svrhu koriste se različite eksperimentalne metode: mikroskopske, termalne analize (diferencijalno – termička analiza, diferencijalna skening kalorimetrija, termogravimetrija), spektroskopske tehnike (infracrvena, Ramanova spektrometrija), difrakcione metode (na monokristalima, polikristalima i prahu) itd.

Ove razlike u fizičkim karakteristikama između kristalnih formi polimorfnih sistema su postale izuzetno interesantne farmaceutima jer njihove manifestacije nekada vode do primetnih razlika među formama, koje dalje unose komplikacije tokom obrade, formulacije i mnogih faza koje testiranje leka obuhvata da bi mogao da bude u prodaji.

Kada je poznato da supstanca ima više polimorfnih stanja, njihove karakteristike se moraju odrediti, kao i način na koji one utiču na kvalitet leka i njegovu efikasnost. Polimorfizam može uticati na svaku fazu u razvoju leka, počev od pretkliničkih ispitivanja pa sve do poslednje faze prodaje, odnosno od ispitivanja njegove bioaktivnosti, bioraspoloživosti, stabilnosti pa sve do uslova pod kojima bi lek trebalo skladištiti, načina transporta i distribucije. Odabir odgovarajućeg polimorfog stanja vrši se na osnovu njegove hemijske stabilnosti i minimalnog potencijala za konverziju u neku drugu formu.

Istraživanja su pokazala da je polimorfizam češći kod jedinjenja koja su slabo rastvorljiva u vodi, kod organskih soli, velikih molekula sa hidratnim grupama, organskih rastvora – neutralnih sa velikom molekulskom masom, i kod jedinjenja koja imaju molekulsku masu veću od 350.

Prema *W. C. Mc Crone*, svako jedinjenje ima različita polimorfna stanja, a broj poznatih za dato jedinjenje proporcionalan je utrošenom vremenu i energiji tokom njegovog istraživanja.

### 2. 3. 3. Primena klopidogrel bisulfata i njegova polimorfna stanja

Klopidogrel bisulfat (*CLP*) je farmaceutsko jedinjenje poznatog mehanizma redukcije posledica ateroskleroze (*atherosclerosis*).

Aterosklerozu je bolest velikih i srednjih mišićnih arterija, karakteriše se nakupljanjem lipida, holesterola, kalcijuma i ćelijskih elemenata unutar zidova krvnog suda. Ovo za posledicu ima akutnu ili hroničnu opstrukciju volumena krvnog suda, poremećen protok krvi, pa samim tim i smanjeno snabdevanje kiseonikom ciljanih tkiva. Faktori koji utiču na nastanak ovog oboljenja i njegov razvoj su: hiperlipidemija, povišen krvni pritisak, dijabetes, konzumiranje cigareta, hipertenzija.

Sимптоматологија атеросклерозе је изузетно разлиčита. Пацијенти оболели од атеросклерозе могу имати prisutne simptome коронарне болести или инфаркта миокарда, neretko први simptom može biti i naprasna srčana smrt jer oboljenje može da postoji čak i decenijama pre nego što izazove kliničke simptome. Najčešće kliničke posledice su: volumenska opstrukcija (progresivna i asimptomatska dok fibrozni plak ne opstruira 50 – 70 % volumena krvnog suda, tek tada nastaju prvi simptomi коронарне болести zbog smanjenog dotoka кисеоника до ciljanog tkiva), ruptura plaka ili tromboza plaka (usled oštećenja fibroznog plaka, odvaja se jedan njegov deo i nastaje tromb koji je pokretan i ukoliko stigne do dela krvnog suda koji je dovoljno uzak može u potpunosti da onemogući protok krvi, što dalje može dovesti do infarkta miokarda, ишемичног напада и шлог; nastajanje tromba posledica je споре циркулације или турбуленије у протоку krvi), angina pektoris (станje карактерисано оштим болом иза грудне kosti, njegovim širenjem ka levoj ruci i otežanim disanjem; angiozni bol je најчешћи simptom infarkta miokarda), шлог или cerebralni insult (настaje опструкцијом крвних судова одговорних за snabdevanje centralnog nervnog sistema), visceralna ишемија, mezenterična angina, aneurizma abdominalne arterije (opasno oboljenje zbog mogućnosti rupture i krvarenja).

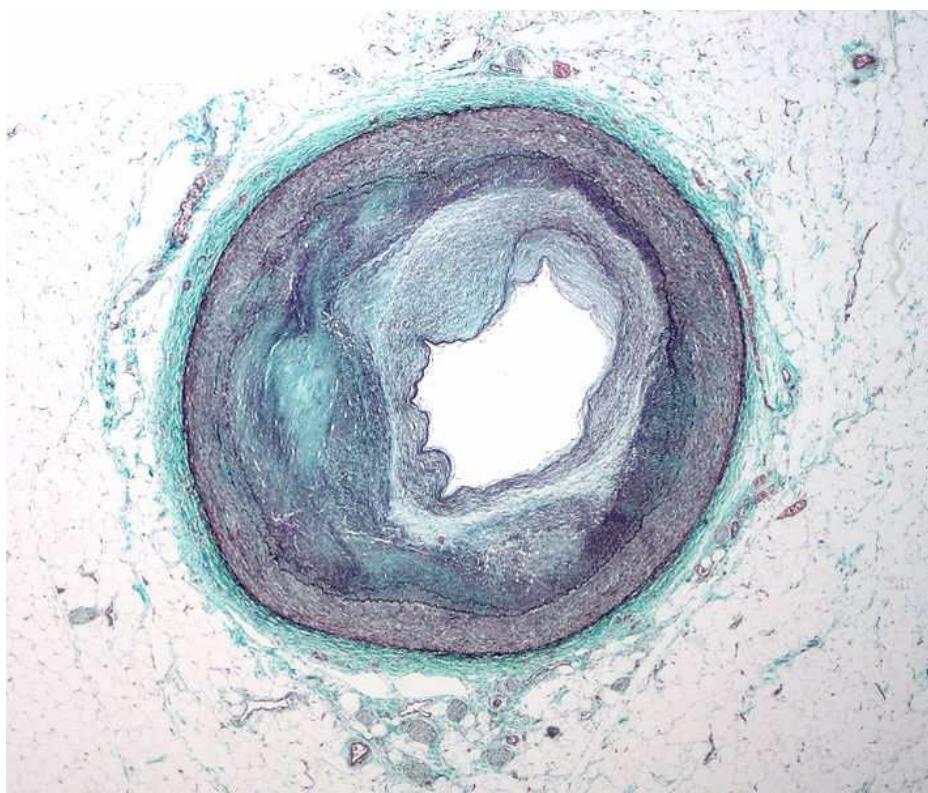
Prevencija ovog oboljenja i terapija u prvoj fazi podrazumevaju eliminisanje poznatih faktora rizika: regulacija povišenog krvnog pritiska, smanjenje lipida u krvi, prestanak pušenja cigareta, lečenje šećerne bolesti, prestanak uzimanja alkohola, uravnotežena ishrana i redovna fizička aktivnost. Sledeća faza u lečenju jeste uzimanje odgovarajućih medikamenata iz različitih grupa: lekovi koji utiču na smanjenje povišenog holesterola i triglicerida, medikamenti koji utiču na smanjenje triglicerida i LDL frakcije holesterola, antioksidansi tj. vitamini C i E koji utiču na smanjenje oksidacije LDL holesterola i derivati nikotinske

kiseline tj. niacina (vitamin B3) koji deluju na skoro sve vrste hiperlipidemija. Poslednja faza u terapiji, ukoliko je neophodna (utvrđuje se dijagnostičkim metodama - elektrokardiogram, stres test, kardijalna kateterizacija, ehokardiogram, kompjuterizovana tomografija, magnetna rezonanca itd.), obuhvata hiruške procedure: angioplastija i ugradnja stenta, operacije na otvorenom srcu, hiruška reparacija abdominalne arterije, ugradnja bajpasa...

Mehanizam nastajanja ateroskleroze i dalje nije u potpunosti poznat. Za sada, najverovatnija teorija je da nastaje usled oksidacije molekula LDL (*low density lipoprotein*) čija je funkcija prenos holesterola kroz organizam, i on je njegov glavni prenosnik. Kada ovakav molekul dođe u kontakt sa zidom arterije, on uzrokuje njen oštećenje. Imuni sistem reaguje šaljući bela krvna zrnca na to mesto, koja bi trebalo da apsorbuju oksidovani LDL molekul. Kako to nije moguće, i ona se talože na mestu oštećenja, rastu i na kraju pucaju, i na ovaj način se zadržava velika količina oksidovanog holesterola u zidovima arterija. Ovo izaziva još veće oštećenje, što uzrokuje pristizanje još većeg broja belih krvnih zrnaca i krug se zatvara. Arterija je pod upalom, plak holesterola uzrokuje povećanje mišićnih ćelija koje prekrivaju oštećenje, i na taj način se smanjuje protok krvi i povećava krvni pritisak.

Aterosklerozu je vodeći uzročnik smrti u mnogim zemljama, stoga je utvrđivanje tačnog mehanizma nastajanja i usavršavanje terapijskih metoda - medikamenata i hiruških procedura, zadatak velikog broja naučnika.

Na slikama 15. i 16. dati su mikrofotografski i autopsijski snimci arterija sa značajnim stepenom ateroskleroze.



Slika 15. Mikrofotografski prikaz ateroskleroze [17]



Slika 16. Autopsijski snimak ateroskleroze aorte [17]

Klopидогрел бисулфат помаже у redukciji posledica ateroskleroze, konkretnije sprečava pojavu tromba; on utiče na smanjeno nagomilavanje trombocita tako što blokira vezivanje ADPa (adenozin difosfat) na njegov receptor na trombocitima i tako zaustavlja aktivaciju GPIIb/IIIa kompleksa.

Trombociti su krvne pločice koje imaju centralnu ulogu u održavanju normalne hemostaze. Hemostazni sistem ima dve primarne funkcije: obezbeđuje tečno stanje u cirkulaciji i zaustavlja krvarenje na mestu oštećenja krvnog suda (prirodnim procesom koji se naziva hemostaza). Dok trombociti normalno cirkulišu, u neaktivnom stanju, oni su glatki diskovi koji na membrani imaju brojne glikoproteinske receptore, npr. već pomenuti GPIIb/IIIa. Glikoproteini predstavljaju vezu trombocita sa njihovom okolinom. Kako trombociti nemaju jedro, oni upravo preko ovih receptora reaguju na različite fiziološke i patološke događaje.

Posle povrede krvnog suda, odnosno povrede endotela, uključujući i rupturu aterosklerotskog plaka, trombociti se susreću sa sastojcima ECMa (ekstracelularni matriks – bilo koji materijal tkiva koji ne ulazi u sastav ćelije), koji se nalazi u formi kolagena i raznih adhezivnih glikoproteina. U kontaktu sa ECMom, trombociti ispoljavaju tri opšte reakcije: adheziju – skupljaju se na mestu oštećenja i menjaju oblik iz diskoidnog u sferični čime povećavaju površinu svoje membrane, sekreciju – luče sadržaj svojih granula i agregaciju – vezuju se jedan za drugi i stvaraju tromb.

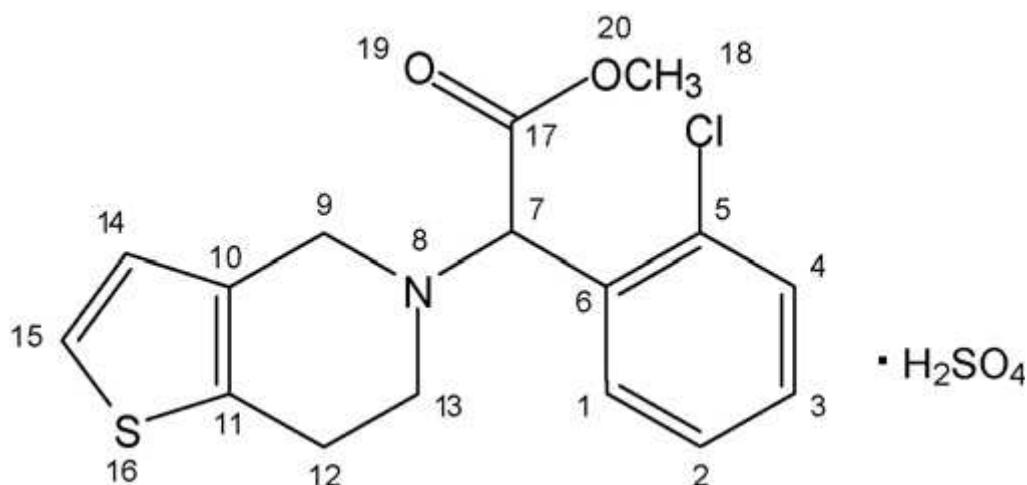
Usled oštećenja zida krvnog suda, subendotelne strukture su izložene dejstvu krvnog toka i same krvi, što vodi do adhezije trombocita – prve faze u formiranju tromba, tj. ugruška. Trombociti na svojoj površini imaju glikoproteinske receptore koji se vezuju za adhezivne proteine i kolagen iz krvnog suda. Trombocit se adhezuje na kolagen preko VWFa (*von Wilebrandov faktor*) koji se veže na određeni glikoproteinski trombocitni receptor. Dalje, dolazi do otpuštanja jona kalcijuma koji omogućuju sledeću fazu – sekreciju trombocitnih granula.

Tokom sekrecije indukuju se brojni faktori koji dovode do agregacije trombocita. Supstance koje se tokom ove faze luče aktiviraju ostale trombocite i doprinose rastu tromba. Guste granule trombocita otpuštaju ADP.

ADP preko trombocitnih receptora utiče na napredak procesa stvaranja tromba i treću fazu – agregaciju trombocita, tokom koje dolazi do konformacije kompleksa GPIIb/IIIa receptora, koji se konvertuje u formu pogodnu za vezivanje fibrinogena i drugih trombocita. Glavnu ulogu u aktivaciji GPIIb/IIIa receptora ima ADP, odnosno otpuštanje jona kalcijuma.

Dejstvo klopidogrel bisulfata ogleda se u ranoj fazi trombocitne aktivacije. Njegova primarna funkcija je sprečavanje degranulacije trombocita i oslobođanje inflamatornih medijatora. On ireverzibilno blokira vezivanje ADP molekula na odgovarajući receptor na trombocitima P2Y<sub>12</sub> inaktivirajući ga i na taj način sekundarno se postiže inhibicija GPIIb/IIIa receptora i trombocitne agregacije.

Poznato je da postoji šest polimorfnih oblika klopidogrel bisulfata, ali u farmaciji su u upotrebi samo polimorfna stanja I i II koja imaju iste indikacije. Njihova razlika je u organizaciji klopidogrel katjona i sulfatnih jona. Obe ove forme imaju sličnu bioaktivnost. Hemijska formula klopidogrel bisulfata je C<sub>16</sub>H<sub>17</sub>ClNO<sub>2</sub>S·HSO<sub>4</sub>, a na slici 17. predstavljena je njegova hemijska struktorna formula.



*Slika 17. Hemijska struktorna formula klopidogrel bisulfata [16]*

Prvo polimorfno stanje klopidogrel bisulfata ima monokliničnu elementarnu čeliju ( $a \neq b \neq c; \alpha = \gamma = 90^\circ \neq \beta$ ) sa parametrima:  $a=12,63 \text{ \AA}$ ,  $b=15,22 \text{ \AA}$ ,  $c=10,43 \text{ \AA}$ ,  $\beta=113,5^\circ$ . Drugo polimorfno stanje ima ortorombičnu jediničnu čeliju ( $a \neq b \neq c, \alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$ ) sa parametrima:  $a=10,32 \text{ \AA}$ ,  $b=20,12 \text{ \AA}$ ,  $c=9,19 \text{ \AA}$ . Tačka topljenja za formu I je  $184^\circ\text{C}$ , a za formu II  $176^\circ\text{C}$ . Forma II ima nižu rastvorljivost od forme I usled veće termodinamičke stabilnosti.

Asimetrična elementarna čelija forme I ima dva nezavisna katjona klopidogrela i dva nezavisna anjona hidrogensulfata. Dva nezavisna katjona su slične konformacije, ali različite od ortorombične forme II. H – N – C – H fragment pokazuje trans konformaciju u obe nezavisne katjone u formi I, a cis konformaciju u formi II. U formi I vodonične veze N – H … O i O – H … O povezuju dva nezavisna katjona i dva nezavisna anjona u izolovan klaster, u kojem dva katjona interaguju sa dva anjona jedino preko N – H … O vodonične veze. Slabe intermolekularne C – H … O vodonične veze obezbeđuju kristalno pakovanje u obe forme. U formi II vodonične veze O – H … O povezuju anjone u linearne lance, dok vodonične veze N

– H … O povezuju jedan katjon i jedan anjon. Ove razlike u kristalnom pakovanju formi I i II mogu dati objašnjenje zašto je forma II manje rastvorljiva, odnosno stabilnija od forme I.

### **3. CILJ RADA**

Kao što je već pomenuto, klopidogrel bisulfat ima 6 polimornih stanja, od kojih su stanja I i II našla svoju primenu u farmaciji i imaju iste indikacije.

Farmaceutska kuca "Hemofarm" a.d. sintetisala je lek koji redukuje posledice ateroskleroze. Sadržaj aktivnih supstanci ovog leka je 75mg prvog polimorfnog stanja klopidogrel bisulfata. Cilj ovog rada je ispitivanje temperaturnih uslova čuvanja ovog leka, odnosno ispitivanje stabilnosti leka i njegove aktivne supstance na različitim temperaturama.

## 4. EKSPERIMENTALNI DEO

Ispitivanje stabilnosti leka rađeno je metodom difrakcije na prahu i difraktometrijskim ispitivanjem strukturnih promena pri različitim temperaturama koje su detaljnije objašnjene u delu 2.1.2.2. *Difraktometar za polikristalne uzorke* i 2.1.2.3. *Difraktometrijsko ispitivanje strukturnih promena pri različitim temperaturama* ovog rada. Dodatna optička ispitivanja vršena su polarizacionim mikroskopom uz kontrolisano grejanje uzorka koji je detaljnije objašnjen u delu 2.2. *Polarizaciona mikroskopija* ovog rada. Merenja su izvršena u Laboratorijama Departmana za fiziku, PMF, Novi Sad.

Difraktogrami su snimani za dva uzorka. Prvi uzorak je prvo polimorfno stanje klopidogrel bisulfata. Drugi uzorak je uzorak leka čiju stabilnost na određenim temperaturama je neophodno utvrditi. Oni su čuvani 12 meseci na temperaturi od 30°C i relativnoj vlažnosti vazduha od 65%. Difraktogram drugog polimorfног stanja klopidogrel bisulfata je poznat od ranije. Difraktometrijsko ispitivanje strukturnih promena pri različitim temperaturama vršeno je za pomenuta dva uzorka. Za ova dva uzorka izvršena su i optička ispitivanja polarizacionim mikroskopom uz kontrolisano grejanje.

### 4. 1. Eksperimentalna aparatura

#### 4. 1. 1. Eksperimentalna aparatura za difrakciju i difraktometrijsko ispitivanje strukturnih promena pri različitim temperaturama



Slika 18. Difraktometar



Slika 19. Difraktometar

Na slikama 18. i 19. prikazan je korišćeni difraktometar za prah. Seifert MZ IV je refleksioni goniometar kojeg kontrolišu dva motora:  $\theta$  sa uglom opsegom od  $0^\circ$  do  $360^\circ$  i  $2\theta$  sa opsegom od  $0^\circ$  do  $161^\circ$  pri  $\theta - 2\theta$  geometriji. Veličinu snopa moguće je kontrolisati i u horizontalnoj i u vertikalnoj ravni. Nosači uzorka su od pleksiglasa i prečnika su 22mm. Detektor je scintilacioni. Rendgenska cev koristi radni napon od 30kV pri struji od 30mA. Zračenje se filtrira pomoću filtera od Nikla, i dobija se monohormatsko zračenje  $K_\alpha$  linije Bakra talasne dužine od 1,54059Å.

Dodatak dvokružnom goniometru je visokotemperaturna komora NTK10 sa upravljačkom jedinicom – sistemom za vakumiranje sa pumpom Edwards E2M5 i difuznom pumpom Diffstak. Maksimalni radni potpritisak je 0,00001mbar. Radna temperatura komore je u opsegu od sobne temperature do  $1800^\circ\text{C}$  sa greškom od  $0,1^\circ\text{C}$  do  $1^\circ\text{C}$ . Komora adaptera se permanentno hlađi vodom. To omogućava apsolutno merenje temperature, a takođe i programirano hlađenje uzorka. Element za grejanje je platinska šina dimenzija 132x9x1mm, a u njenom centru se nalazi Pt-10%RhPt termopar dijametra 0,35mm i dužine 90mm.

#### 4.1.2. Eksperimentalna aparatura za polarizacionu mikroskopiju



*Slika 20. Polarizacioni mikroskop*

Na slici 20. prikazan je korišćeni polarizacioni mikroskop Carl Zeiss (Jena). Ovaj polarizacioni mikroskop radi u transparentnoj i polarizovanoj svetlosti, sa okularom 8x18, tri moguća objektiva i sa specijalnim dodatkom za kontrolisano grejanje uzorka. Grejni element povezan je sa temperaturnim regulatorom koji može da održava temperaturu sa greškom od  $\pm 0,05^{\circ}\text{C}$  u opsegu od sobne temperature do  $250^{\circ}\text{C}$ .

### 4.2. Tok eksperimenta

#### 4.2.1. Difraktometrijska ispitivanja

Uzorci koji su u formi tableta se što je sitnije moguće sprašuju pomoću avana, zatim se nosači napune dobijenim prahovima i postavljaju na držač uzorka, kao što je prikazano na slici 21. Iako se sa slike vidi da na držaču za uzorak postoje četiri mesta za nosače, snimanja su vršena za svaki uzorak odvojeno.



Slika 21. Difraktometar

Uglovni interval, za vrednost  $2\theta$ , u kojem su praćena rasejanja je od  $6^\circ$  do  $40^\circ$ . Korak promene ugla je  $0,02^\circ$  na svakih 15s. Nakon podešavanja ovih parametara, pristupljeno je snimanju difraktograma za svaki od navedena četiri uzorka. Scintilacioni detektor povezan je sa računarom na kojem se rezultati prezentuju u digitalnoj formi.

Pri ispitivanju strukturnih promena na različitim temperaturama, uzorak u formi praha, se nanosi u tankom sloju direktno na grejač u komori, na koji je prethodno nanet specijalni lepak tzv. šelak. Za pomenute uzorke snimani su difraktogrami na temperaturama  $40^\circ\text{C}$ ,  $50^\circ\text{C}$  i  $60^\circ\text{C}$ . Za prvo polimorfno stanje klopidogrel bisulfata sniman je difraktogram i na temperaturi  $150^\circ\text{C}$ , a za uzorak leka L-3044/P/01 na temperaturi  $130^\circ\text{C}$ . Uglovni interval, za vrednost  $2\theta$ , u kojem su praćena rasejanja je od  $2^\circ$  do  $30^\circ$ .

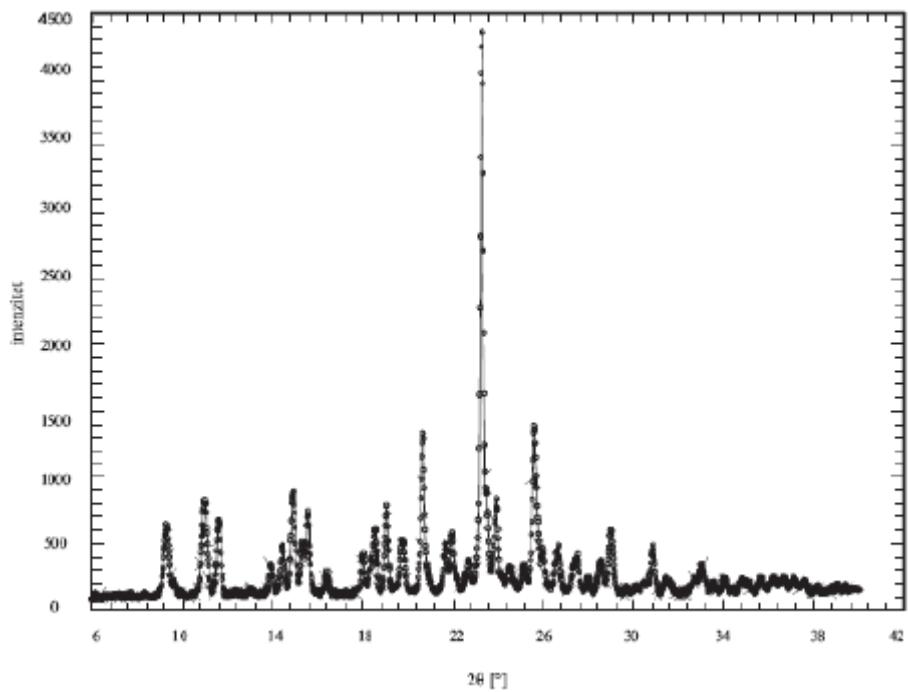
#### 4.2.2. Polarizaciona mikroskopija

Ispitivanje uzorka se vrši u ortoskopskoj tehnici, u polarizovanoj svetlosti, sa ukrštenim polarizatorom i analizatorom. Posmatranje je vršeno sa objektivom 12,5x. Uzorci se sprašuju pomoću avana i postavljaju na predmetno staklo. Nakon posmatranja njihove strukture na sobnoj temperaturi, zagrevani su na  $40^\circ\text{C}$ ,  $50^\circ\text{C}$  i  $60^\circ\text{C}$ . Nakon svake dostignute temperature, uzorak se održavao na toj temperaturi i vršena su posmatranja nakon 15min, 1h, 3h i 6h. Nakon 6h održavanja uzorka na temperaturi od  $60^\circ\text{C}$ , vršeno je određivanje tačke topljenja za svaki od navedena dva uzorka.

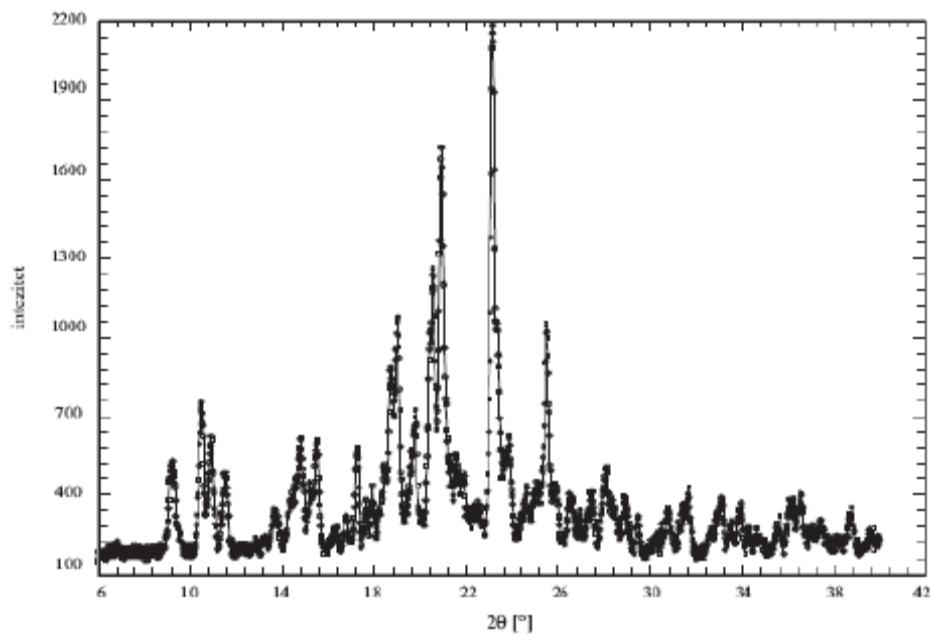
## 5. REZULTATI I DISKUSIJA

### 5.1. Difraktometrijska ispitivanja

Na slikama 22. i 23. predstavljeni su difraktogrami uzoraka prvog polimorfnog oblika klopidogrel bisulfata i uzorka leka L-3044/P/01, respektivno, koji su snimani na sobnoj temperaturi, nakon 12 meseci čuvanja na temperaturi od 30°C i vlažnosti vazduha od 65%. Difraktogram drugog polimorfnog oblika klopidogrel bisulfata poznat je od ranije.

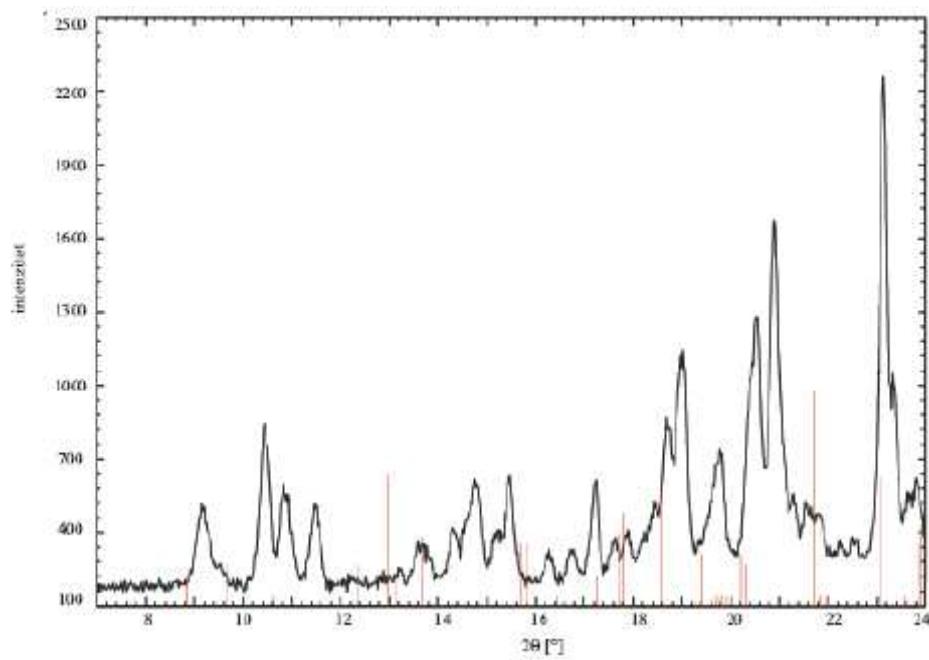


Slika 22. Difraktogram prvog polimorfnog oblika klopidogrel bisulfata



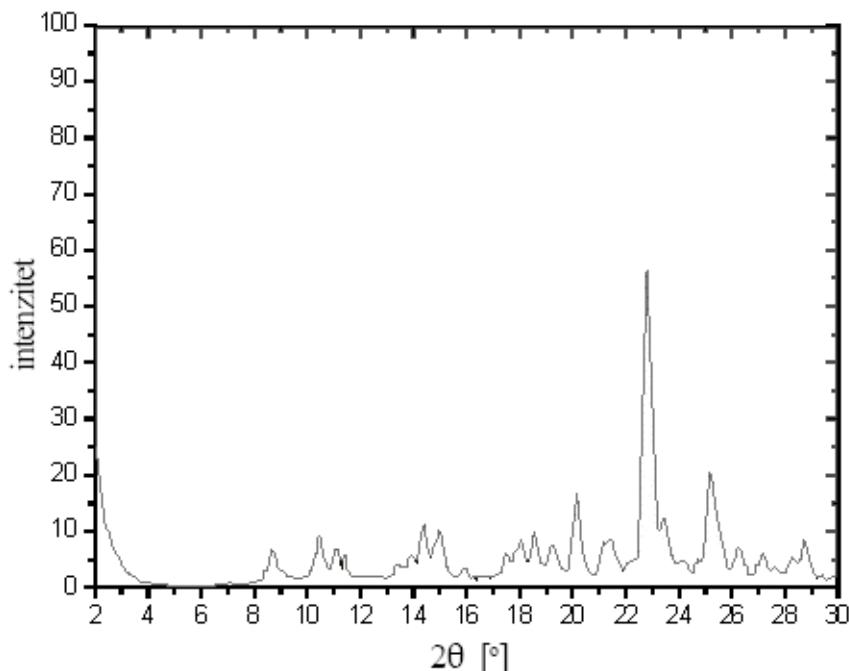
*Slika 23. Difraktogram uzorka leka L-3044/P/01*

Sa difraktograma prvog polimorfnog oblika klopidogrel bisulfata (Slika 22.) vidi se da ovo polimorfno stanje pokazuje najintenzivniji pik za vrednost ugla  $2\theta$  od  $23,2^\circ$  što je najintenzivniji pik i za difraktogram uzorka leka L-3044/P/01. Da je aktivna supstanca pomenutog leka upravo prvo polimorfno stanje klopidogrel bisulfata pokazuje i slika 24. na kojoj je predstavljeno preklapanje od ranije poznatog difraktograma drugog polimorfnog oblika ove supstance (crvena boja na grafiku) i uzorka leka L-3044/P/01 (crna boja na grafiku). Ni jedan od značajnijih pikova drugog polimorfnog oblika klopidogrel bisulfata, posebno u uglovnom intervalu  $2\theta$  od  $12^\circ$  do  $14^\circ$  se ne pojavljuje na difraktogramu uzorka leka. Prag detekcije ove metode je 2%, stoga je neophodno ograničenje da se drugo polimorfno stanje klopidogrel bisulfata ne registruje u uzorku leka L-3044/P/01 u procentu većem od 2%.

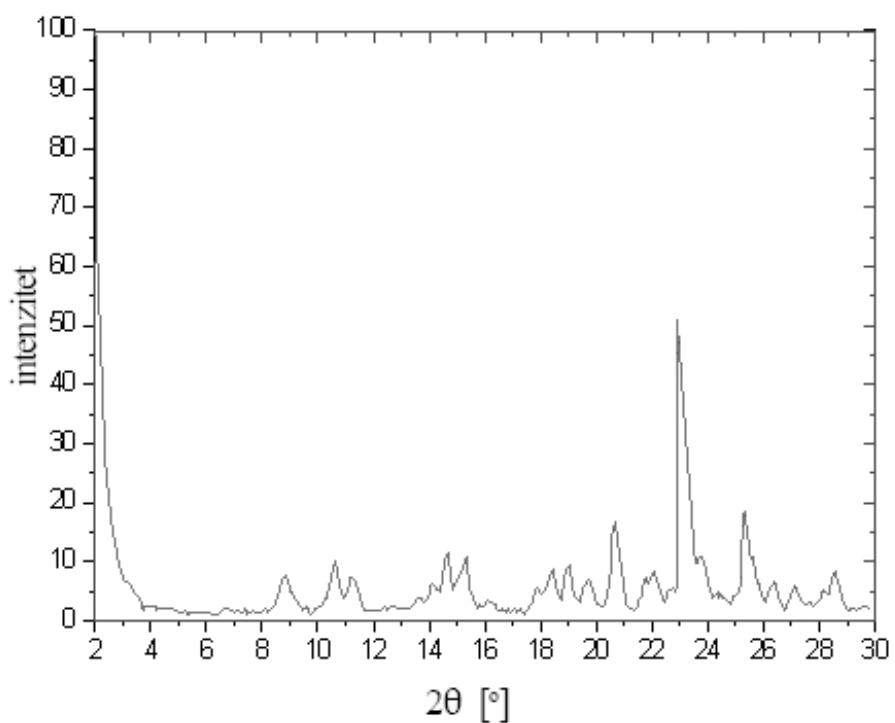


*Slika 24. Preklapanje difraktograma uzorka leka L-3044/P/01 i drugog polimornog oblika klopidogrel bisulfata*

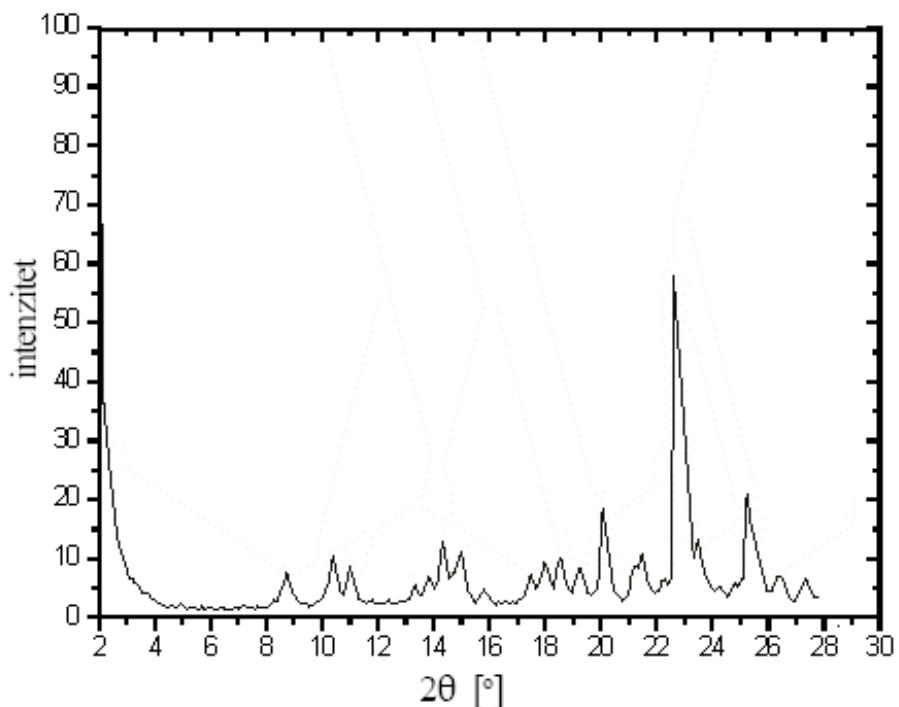
Na slikama 25., 26., 27., i 28. predstavljeni su difraktogrami uzorka prvog polimornog oblika klopidogrel bisulfata na temperaturama 40°C, 50°C, 60°C i 150°C, respektivno. Najintenzivniji pik na 23,2° koji je primećen na difraktogramu koji je sniman za ovaj uzorak na sobnoj temperaturi, uočava se na sva četiri difraktograma, što ukazuje na njegovu stabilnost na ovim temperaturama. Uočeno je smanjenje intenziteta pika sa povećanjem temperature.



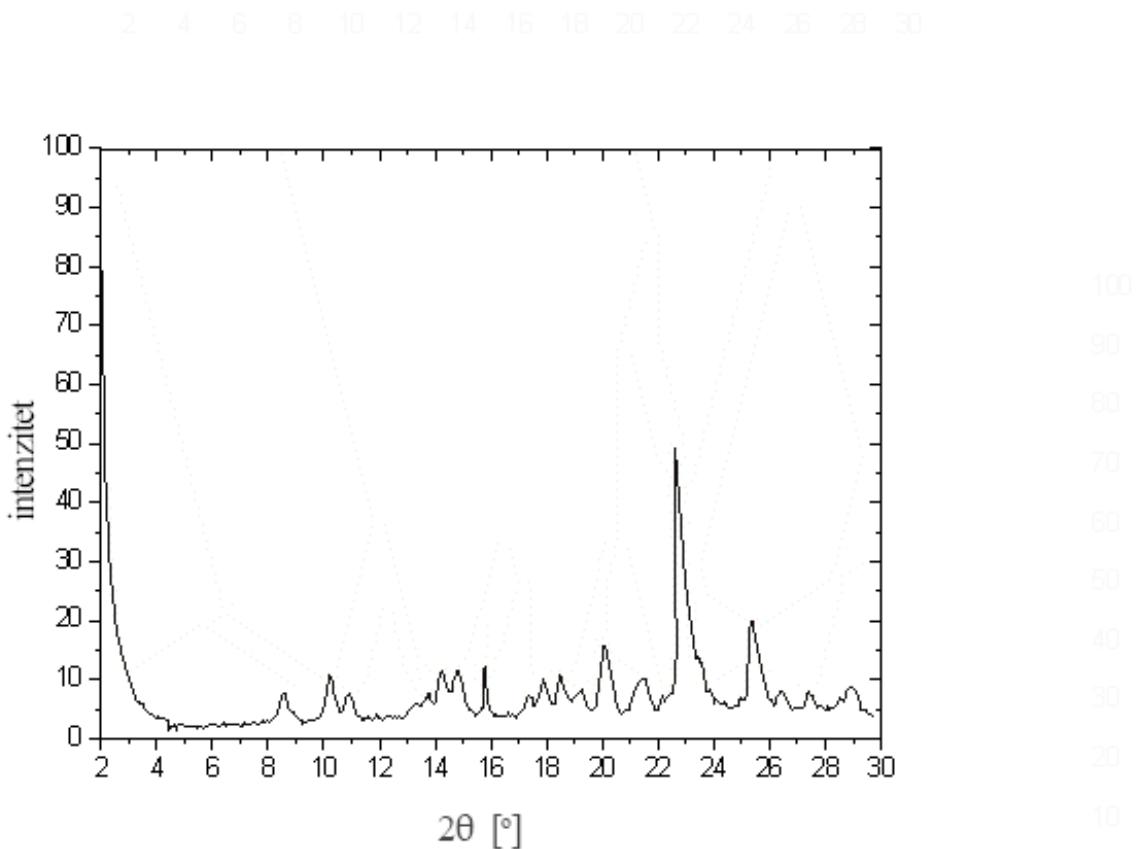
*Slika 25. Difraktogram uzorka prvog polimornog oblika klopidogrel bisulfata na temperaturi 40°C*



Slika 26. Difraktogram uzorka prvog polimorfnog oblika klopidogrel bisulfata na temperaturi  $50^{\circ}\text{C}$



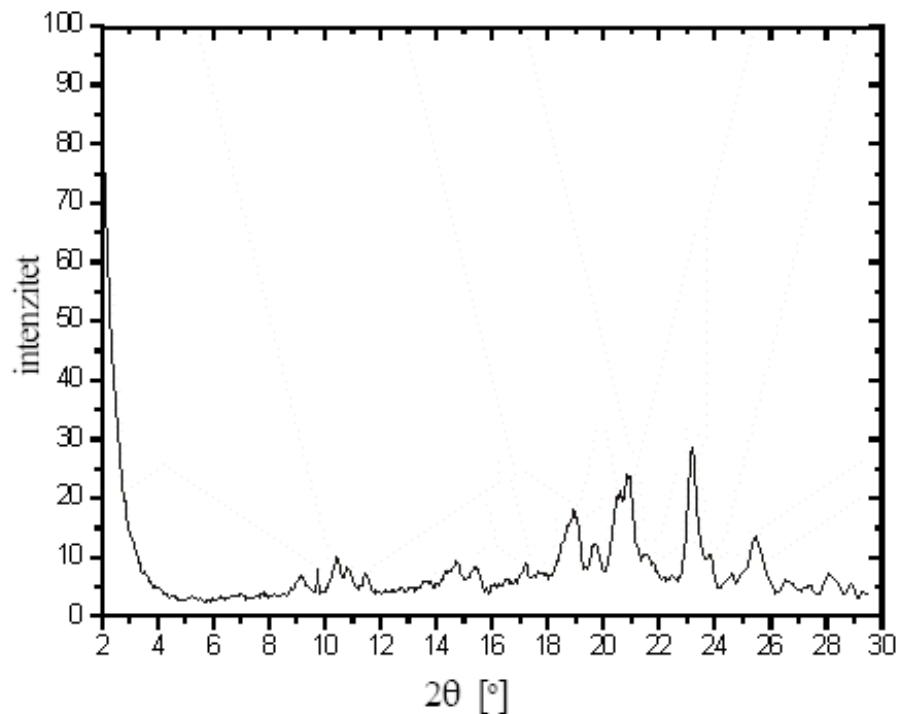
Slika 27. Difraktogram uzorka prvog polimorfnog oblika klopidogrel bisulfata na temperaturi  $60^{\circ}\text{C}$



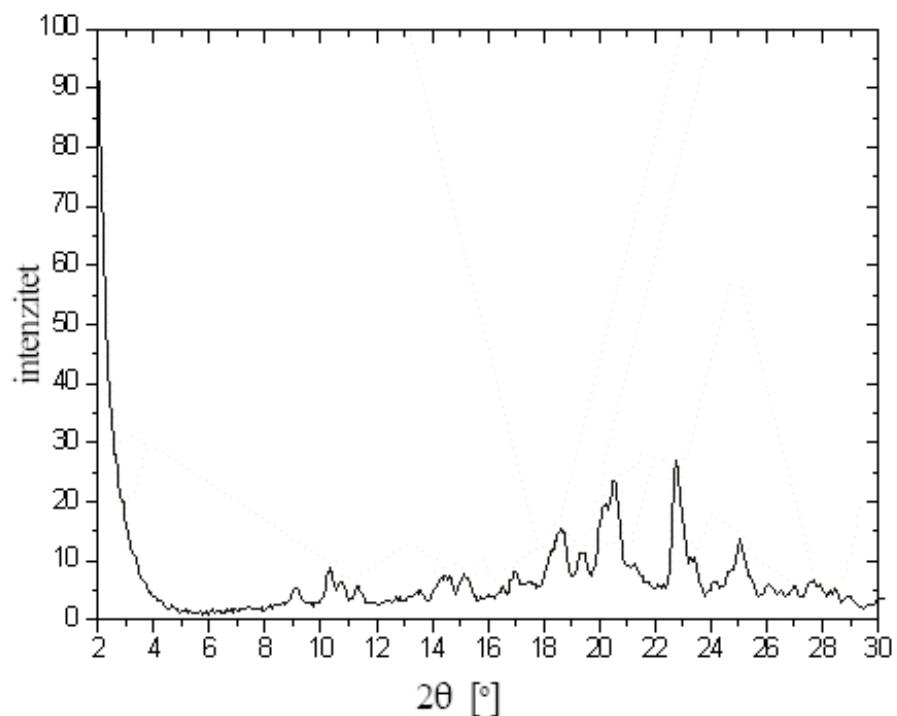
*Slika 28. Difraktogram uzorka prvog polimornog oblika klopidogrel bisulfata na temperaturi 150°C*

Na slikama 29., 30., 31. i 32. predstavljeni su difraktogrami uzorka leka L-3044/P/01 na temperaturama 40°C, 50°C, 60°C i 130°C, respektivno. Najintenzivniji pikovi se poklapaju na difraktogramima snimanim na svim temperaturama. Njihovim poređenjem sa difraktogramom leka koji je sniman na sobnoj temperaturi, dolazi se do zaključka da se pikovi poklapaju, i da uzorak nije pretrpeo strukturne promene sa povećanjem temperature.

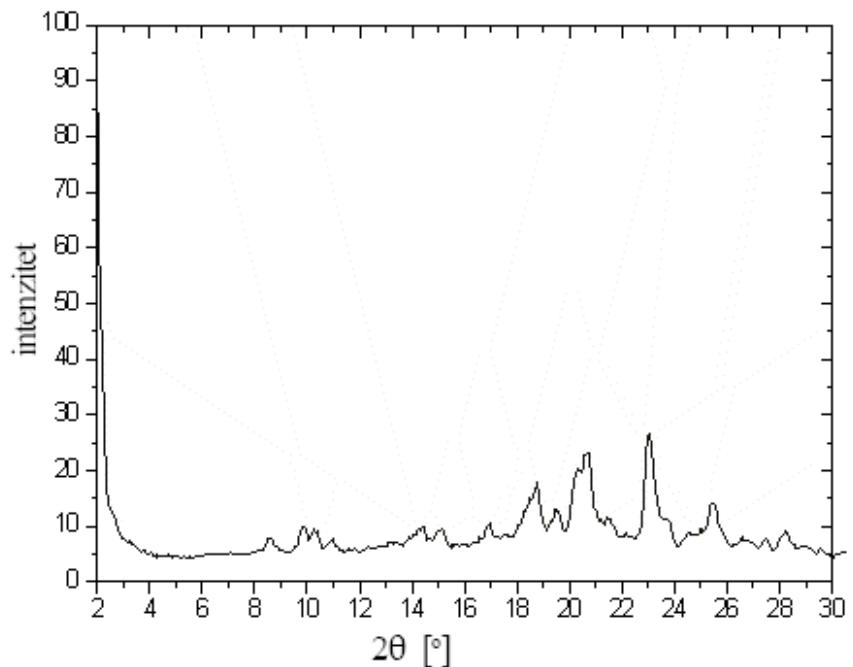
Ovim difraktometrijskim ispitivanjima na različitim temperaturama, dokazana je temperaturna stabilnost leka i njegove aktivne supstance.



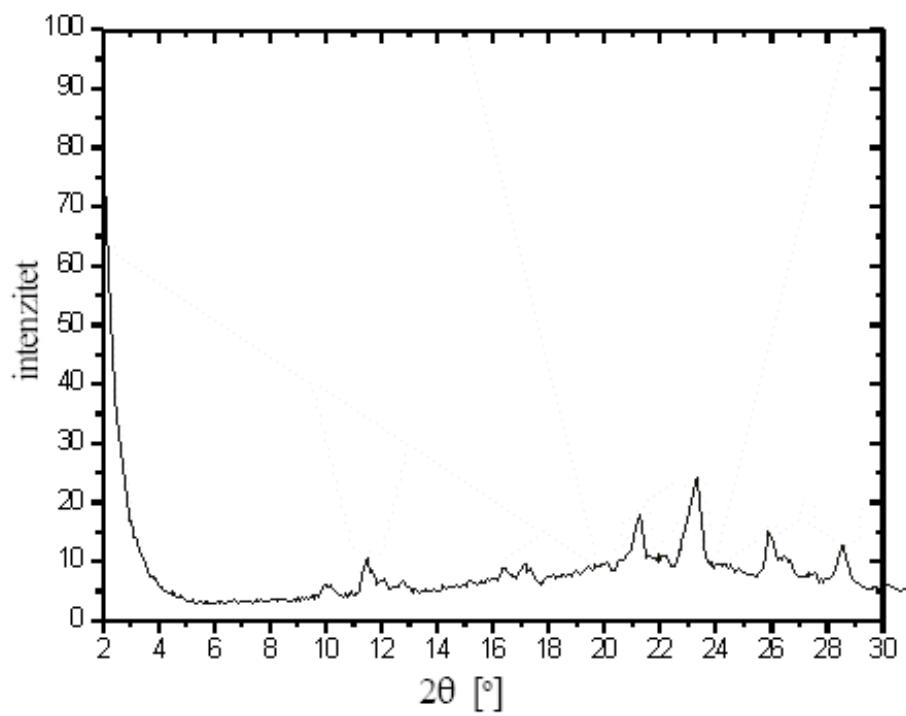
Slika 29. Difraktogram uzorka leka L-3044/P/01 na temperaturi  $40^\circ C$



Slika 30. Difraktogram uzorka leka L-3044/P/01 na temperaturi  $50^\circ C$



Slika 31. Difraktogram uzorka leka L-3044/P/01 na temperaturi  $60^{\circ}\text{C}$



Slika 32. Difraktogram uzorka leka L-3044/P/01 na temperaturi  $130^{\circ}\text{C}$

## 5.2. Polarizaciona mikroskopija

Nakon zagrevanja pomenutih uzoraka do temperature od 60°C, ispitivanje njihove strukture metodom polarizacione mikroskopije nije pokazalo nikakve vidljive promene u odnosu na njihove strukture na sobnoj temperaturi. I ova metoda potvrđuje da su i uzorak prvog polimorfognog obika klopidogrel bisulfata i uzorak leka L-3044/P/01 stabilni do temperature od 60°C.

Ovom metodom određene su i tačke topljenja pomenutih uzoraka. Za prvo polimorfno stanje klopidogrel bisulfata uočeno je topljenje na temperaturi 173°C. Uzorak leka predstavlja višekomponentnu smešu. Prva faza topljenja počinje na temperaturi 154°C, a topljenje celog uzorka završeno je na temperaturi 210°C.

## **6. ZAKLJUČAK**

Dva od šest polimorfnih stanja klopidogrel bisulfata su našla primenu u farmaciji. "Hemofarm a.d." sintetisao je lek koji redukuje posledice ateroskleroze a čija je aktivna supstanca prvi polimorf klopidogrel bisulfata. Difraktometarskom metodom i polarizacionom mikroskopijom, u Laboratorijama Departmana za fiziku u Novom Sadu, ispitivana je stabilnost aktivne supstance i stabilnost samog leka na različitim temperaturama, odnosno proveravana je mogućnost prelaska prvog polimorfnog oblika klopidogrel bisulfata u drugi na sobnoj temperaturi i temperaturama 40°C, 50°C i 60°C i na temperaturama bliskim tačkama topljenja uzorka - 150°C i 130°C za prvi polimorfni oblik klopidogrel bisulfata i uzorak leka L-3044/P/01, respektivno.

Nakon čuvanja leka na temperaturi od 30°C i relativnoj vlažnosti vazduha od 65% nema pojave drugog polimorfnog oblika klopidogrel bisulfata u uzorcima leka u procentu većem od 2% na sobnoj temperaturi, koliko je prag detekcije korišćene difraktometarske metode. Pomenuti uslovi čuvanje leka ne menjaju njegov fazni sastav, i ovim je dokazana njegova stabilnost na sobnoj temperaturi.

Difraktometarskim ispitivanjima na pomenutim temperaturama nisu uočene strukturne promene ni leka ni njegove aktivne supstance, uočeno je samo smanjenje intenziteta značajnijih pikova sa povećanjem temperature.

Posmatranje strukture na pomenutim temperaturama metodom polarizacione mikroskopije takođe nije pokazalo promenu strukture ispitivanih uzorka.

Ovim ispitivanjima utvrđena je stabilnost leka i njegove aktivne supstance na pomenutim temperaturama u okvirima greške korišćenih metoda.

Farmaceutsko tržište Srbije bogatije je za još jedan lek koji redukuje posledice ateroskleroze. Prema izveštaju American Heart Association-a, aterosklerozu je uzročnik čak 75% ukupnih smrti koje su rezultat kradiovaskularnih oboljenja. U poslednjih deset godina uočen je eksponencijalni rast broja obolelih od ove bolesti u zemljama u razvoju zahvaljujući visokom procentu pušača, nedovoljnoj fizičkoj aktivnosti i sve većem korišćenju masti u svakodnevnoj ishrani.

## 7. LITERATURA

- [1] Petrović D. M., Lukić S. R., Eksperimentalna fizika kondenzovane materije, 2000., Univerzitet u Novom Sadu, Novi Sad
- [2] <http://sr.wikipedia.org/sr-el/EXAFS>
- [3] Janić I., Interna skripta – Osnovi atomske fizike I deo, 1992., PMF – Departman za fiziku, Novi Sad
- [4] <http://used-medicalequipmentblog.blogspot.com/2011/05/advances-in-ct-scanner-x-ray-tubes.html>
- [5] [http://www.iucr.org/\\_\\_data/assets/pdf\\_file/0010/721/chap4.pdf](http://www.iucr.org/__data/assets/pdf_file/0010/721/chap4.pdf)
- [6] <http://pd.chem.ucl.ac.uk/pdnn/inst1/optics2.htm>
- [7] [http://serc.carleton.edu/research\\_education/geochemsheets/techniques/XRD.html](http://serc.carleton.edu/research_education/geochemsheets/techniques/XRD.html)
- [8] <http://epswww.unm.edu/xrd/xrdclass/01-XRD-Intro.pdf>
- [9] Bernstein Joël, Polymorphism in Molecular Crystals, 2002., Oxford Science Publications
- [10] Hilfiker Rolf, Polymorphism in the Pharmaceutical Industry, 2006., Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KgaA, Weinheim, Germany
- [11] [http://en.wikipedia.org/wiki/Polymorphism\\_%28materials\\_science%29](http://en.wikipedia.org/wiki/Polymorphism_%28materials_science%29)
- [12] <http://www.scribd.com/doc/47274512/Elekrotehnicki-materijali>
- [13] Brittain G. Harry, Polymorphism in Pharmaceutical Solids, 2009., Informa Healthcare USA, Inc
- [14] <http://nauka.rs/novi-oblici-ugljenika-sjajniji-i-skuplji-od-dijamanta>
- [15] Burger A., Ramberger R., On the Polymorphism of Pharmaceuticals and Other Molecular Crystals I, 1979., Mikrochimica Acta (Wien)
- [16] Dhara K. Rajjada, Bhagwat Prasad, Amrit Paudel, Ravi P. Shah, Saranjit Singh, Characterization of degradation products of amorphous and polymorphic forms of clopidogrel bisulphate under solid state stress conditions, 2009., Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 52 (2010) 332–344
- [17] <http://en.wikipedia.org/wiki/Atherosclerosis>
- [18] <http://farmaceuti.com/tekstovi/uncategorized/inhibitori-agregacije-trombocita>
- [19] Grupa autora, Biomaterijali, 2010., Institut tehničkih nauka Srpske akademije nauka i umetnosti
- [20] <http://medicinskicasopis.org/pdf/2011%281%29/sr/Full/Antiagregaciona%20terapija.pdf>
- [21] Vladimir V. Chernyshev, Sergey V. Pirogov, Irina N. Shishkina, Yurii A. Velikodny, Monoclinic form I of clopidogrel hydrogen sulfate from powder diffraction data, 2010., Acta Crystallographica, Section E, Structure Reports ISSN 1600-5368
- [22] Arini Setiawati, The importance of bioequivalence study: focus on clopidogrel, 2011., Med J Indones, Volume 20, Issue 2
- [23] Gandhi Saurabh and Chandrul Kaushal, Pharmaceutical Solid Polymorphism in Abbreviated New Drug Application (ANDA) – A Regulatory Perspective, 2011., Journal of Chemical and Pharmaceutical Research, Volume 3, Issue 0975-7384
- [24] <http://www.rgf.bg.ac.rs/predmet/GO/I%20semestar/Opsta%20mineralogija/Vezbe/minerali%20u%20mikroskopu.pdf>
- [25] <http://www.microscopyu.com/articles/polarized/polarizedintro.html>
- [26] <http://sirius.mtm.kuleuven.be/Research/Equipment/Mechanical/Seifert.html>
- [27] Vishal Koradia, Garima Chawla, Arvind K. Bansal, Qualitative and quantitative analysis of clopidogrel bisulphate polymorphs, 2004., Acta Pharm. 54 (2004.) 193–204

UNIVERZITET U NOVOM SADU  
PRIRODNO-MATEMATIČKI FAKULTET

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

*Redni broj:*

**RBR**

*Identifikacioni broj:*

**IBR**

*Tip dokumentacije:*

**TD**

Monografska dokumentacija

**TZ**

Tekstualni štampani materijal

**Vrsta rada:**

**VR**

Master rad

**Autor:**

**AU**

Jasmina Čubrilo

*Mentor:*

**MN**

Dr Maja Stojanović

*Naslov rada:*

**NR**

Uticaj temperature na strukturu klopidogrel bisulfata u praškastim uzorcima

*Jezik publikacije:*

**JP**

srpski (latinica)

*Jezik izvoda:*

**JI**

srpski/engleski

*Zemlja publikovanja:*

**ZP**

Srbija

*Uže geografsko područje:*

**UGP**

Vojvodina

*Godina:*

**GO**

2012

*Izdavač:*

**IZ**

Autorski reprint

*Mesto i adresa:*

**MA**

Prirodno-matematički fakultet, Trg Dositeja Obradovića 4, Novi Sad

*Fizički opis rada:*

**FO**

(7/17/15/1/42/27/)

*Naučna oblast:*

**NO**

Fizika

*Naučna disciplina:*

**ND**

Medicinska fizika

*Predmetna odrednica/ ključne reči:*

**PO**

Klopidogrel bisulfat, polimorfizam, rendgenska strukturna analiza, polarizaciona mikroskopija

**UDK**

Cuva se:

**ČU**

Biblioteka departmana za fiziku, PMF-a u Novom Sadu

*Važna napomena:*

**VN**

nema

*Izvod:*

**IZ**

Klopidogrel bisulfat ima 6 polimornih oblika, od kojih su oblici I i II našli svoju primenu u farmaciji i imaju iste indikacije. Farmaceutska kuća "Hemofarm" a.d. sintetisala je lek čiji je sastav aktivnih supstanci 75mg prvog polimornog oblika klopidogrel bisulfata. Utvrđivanje stabilnosti ovog leka i njegove aktivne supstance na različitim temperaturama, izvršeno je difraktometrijskim ispitivanjem na praškastim uzorcima i polarizacionom mikroskopijom.

*Datum prihvatanja teme od NN veća:*

**DP**

Oktobar, 2012.

*Datum odbrane:* Oktobar, 2012.  
**DO**

*Članovi komisije:*  
**KO**

*Predsednik:* Doc. Dr Olivera Klisurić  
*član:* Dr Maja Stojanović  
*član:* Prof. Dr Srđan Rakić

UNIVERSITY OF NOVI SAD  
FACULTY OF SCIENCE AND MATHEMATICS

KEY WORDS DOCUMENTATION

*Accession number:*

**ANO**

*Identification number:*

**INO**

*Document type:*

**DT**

Monograph publication

**TR**

Textual printed material

**CC**

Final paper

**AU**

Jasmina Čubrilo

*Mentor/comentor:*

**MN**

PhD Maja Stojanović

**TI**

Temperature dependence on the structure of Clopidogrel Bisulphate in Active Pharmaceutical Ingredients and Tablets  
Serbian (Latin)

**LT**

English

**LA**

Serbia

**CP**

Serbia

**LP**

Vojvodina

**PY**

2012

**PU**

Author's reprint

**PP**

Faculty of Science and Mathematics, Trg Dositeja Obradovića 4, Novi Sad

**PD**

(7/17/15/1/42/27)

**SF**

Physics

**SD**

Medical Physics

**SKW**

Clopidogrel bisulphate, polymorphism, powder diffraction, polarized light

microscopy

**UC**

Library of Department of Physics, Trg Dositeja Obradovića 4

**HD**

none

**N**

Six different polymorphic forms of clopidogrel bisulphate have been

*Abstract:*

**AB**

identified, but only forms I and II are used in pharmaceutical formulations,

and both of these forms have the same indications. Pharmaceutical

company "Hemofarm" a.d. has synthesized a new drug that contains form I

as API (active pharmaceutical ingredient). Temperature dependence on the

structure of this drug and his API were performed using XRPD and

polarized light microscopy.

*Accepted by the Scientific Board:*

**ASB**

October, 2012.

*Defended on:* October, 2012.  
**DE**  
*Thesis defend board:*  
**DB**  
*President:* Doc. Dr Olivera Klisurić  
*Member:* Prof. Dr Maja Stojanović  
*Member:* Prof. Dr Srđan Rakić

## *Biografija*



Jasmina Čubrilo rođena je 04. 10. 1983. godine u Kikindi. Osnovnu školu "Vuk Karadžić" završava u svom rodnom mestu i uporedo sa njom završava i nižu muzičku školu "Slobodan Malbaški". Godine 1998. nagrađena je Oktobarskom nagradom, i iste godine upisuje gimnaziju "Dušan Vasiljev" (prirodno - matematički smer) u Kikindi. Nakon završene gimnazije, 2002. godine upisuje se na studije fizike na Departmanu za fiziku Prirodno – matematičkog fakulteta u Novom Sadu, smer medicinska fizika. 2011. godine stiče zvanje diplomiranog fizičara medicinske fizike i iste godine upisuje master studije na Prirodno – matematičkom fakultetu u Novom Sadu.