

## DU POLYMORPHISME DE LA KHELLINE

A. CHAUVET, A. TEROL, G. DE MAURY, R. MALAVIOLLE et J. MASSE

*Laboratoire de Chimie Générale et Minérale, Faculté de Pharmacie, 34060-Montpellier (France)*

(Received 18 July 1988)

### ABSTRACT

We have obtained several polymorphs of khellin by recrystallization in some organic solvents under different temperature and pressure conditions: form **I** ( $T_f$  153.0 °C), form **III** ( $T_f$  149.0 °C), form **IV** ( $T_f$  145.0 °C). We have also isolated and identified using thermoanalytical methods and X-ray diffraction four polymorphs which translate during heating into form **I**, and three which translate into form **III**. Form **II** ( $T_f$  150.00 °C) has been identified with other polymorphs; this form has been isolated previously during heating and cooling cycles. Some samples were constituted by several polymorphs. Khellin is a good example of a drug showing many possibilities of hydrogen bonds between molecules.

### RESUME

Nous avons obtenu de nombreuses formes polymorphes de la khelline par recristallisation dans divers solvants organiques dans des conditions de températures et de pression différentes; la forme **I** ( $T_f$  153,0 °C), la forme **III** ( $T_f$  149,0 °C), la forme **IV** ( $T_f$  145,0 °C). Nous avons isolé et identifié par les méthodes thermoanalytiques et la diffraction de rayons X quatre formes se transformant au cours du chauffage en la forme **I** et trois formes en la forme **III**. La forme **II** ( $T_f$  150,0 °C) isolée antérieurement au cours de cycle de chauffage-refroidissement a été identifiée en présence d'autres formes polymorphes. Plusieurs échantillons étaient constitués de plusieurs formes polymorphes. La khelline illustre bien les possibilités nombreuses de formation de liaisons hydrogène entre molécules.

### INTRODUCTION

Poursuivant notre travail de recherche dans le domaine du polymorphisme de médicaments chimiques [1-4] nous rapportons présentement les résultats relatifs à la khelline.

Nous avons observé antérieurement l'existence de deux formes cristallines de la khelline [5]. Plus récemment Abdallah et al. [6] ont indiqué l'existence d'une forme qui ne semble pas avoir été décrite précédemment.

La structure cristalline de deux formes différentes a été établie par Beale [7] et Salem et al. [8]; ces formes provenaient de recristallisation dans des

solvants différents, toutefois les conditions de température et de pression n'ont pas été précisées. De plus aucune indication n'est apportée quant à la température de fusion.

Il nous a paru intéressant d'effectuer des recristallisations de la khelline afin de préciser l'influence de la nature du solvant, des conditions de température et éventuellement de pression pour l'obtention des formes polymorphes de ce principe actif.

## PARTIE EXPERIMENTALE

### *Appareils*

Nous avons utilisé l'analyseur thermique différentiel Du Pont de Nemours 990 avec les modules pour l'analyse calorimétrique différentielle dont le principe a été décrit par Baxter [9] et pour l'analyse thermogravimétrique (module 951), le microscope polarisant Leitz SM POL et la platine chauffante Mettler FP52 à chauffage et refroidissement programmé par l'appareil de commande Mettler FP5, l'appareil Mettler à détermination automatique de la température de fusion, composé du four FP51, du programmeur FP5 et de l'enregistreur GA 11, le système d'analyse thermique FP800 Mettler relié à un microordinateur Epson HX 20 permettant d'évaluer les températures et les domaines de fusion, de cristallisation, de transformation ainsi que les enthalpies correspondantes.

### *Conditions opératoires*

Pour l'examen thermogravimétrique, la sensibilité choisie est  $1 \text{ mg pouce}^{-1}$  pour la courbe TG et  $0,5 \text{ mg min}^{-1} \text{ pouce}^{-1}$  pour la courbe TGD.

En analyse calorimétrique différentielle (ACD), les prises d'essai sont de l'ordre du milligramme, la vitesse de chauffage de  $10$  ou  $20^\circ \text{C min}^{-1}$ , la sensibilité étant choisie en fonction de la quantité de chaleur absorbée ou dégagée par l'échantillon.

Toutes les manipulations sont effectuées en capsules ordinaires serties et sous atmosphère d'azote.

Les mesures de la température et de la cinétique de fusion par modification de la transparence à l'aide de l'appareil Mettler sont effectuées en tube capillaire. Les températures de fusion sont lues par affichage direct (A) et déterminées à partir de la courbe de fusion (B) pour des vitesses programmées de  $10$ ,  $2$  et  $1^\circ \text{C min}^{-1}$ , le chauffage débutant à des températures inférieures de  $5^\circ \text{C}$  ( $T_d = T_f - 5$ ) ou de  $10^\circ \text{C}$  ( $T_d = T_f - 10$ ) à celle de la fusion  $T_f$  du produit.

Le domaine de fusion est déterminé à partir des courbes de fusion, l'écart type sur la moyenne est calculé à l'aide de cinq déterminations, le seuil de probabilité étant choisi égal à  $0,5$  selon la loi de Student.

L'examen thermomicroscopique s'effectue sur l'échantillon avant et après fusion; les conditions de recristallisation sont précisées en fonction de la vitesse de refroidissement ou de chauffage lors d'une solidification vitreuse.

## RESULTATS

### *Réactif*

La khelline (diméthoxy-4,9 méthyl-7,5H-furo [3,2-g] [1] benzopyranone-5) est retirée des fruits du Khella ou Ammi visnaga Lamk (ombéllifères). Elle peut être obtenue également par synthèse. La khelline figure à la VIII<sup>e</sup> édition de la Pharmacopée Française.

### *Etude thermogravimétrique de l'échantillon commercial*

L'examen thermogravimétrique met en évidence un début de perte de poids à 165°C (Fig. 1), la température de fusion étant ( $T_f$  153°C); elle s'effectue en trois stades. Les résultats obtenus par thermogravimétrie sont rapportés dans le Tableau 1.

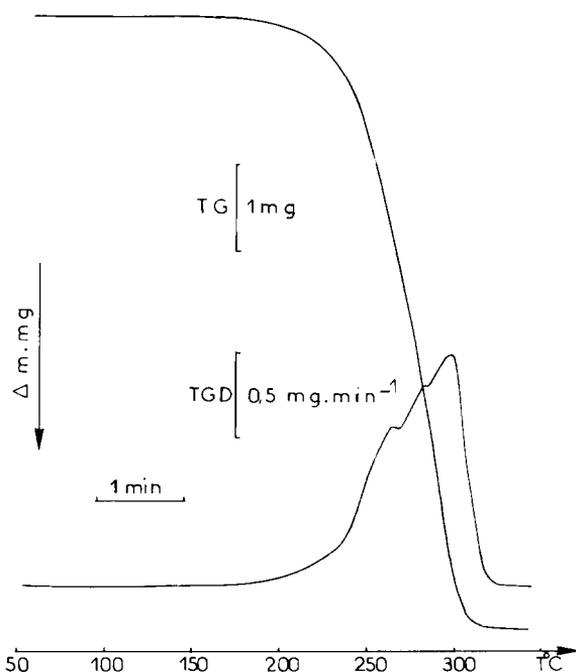


Fig. 1. Courbe thermogravimétrique (TG) et thermogravimétrique dérivée (TGD). Prise d'essai 7,25 mg.

TABLEAU 1

Résultats de l'analyse thermogravimétrique de l'échantillon commercial de khelline; prise d'essai 7,25 mg

Stade de décomposition	Température de perte de poids (° C)		Vitesse de perte de poids (mg min <sup>-1</sup> )
	début	fin	
I	165	265	0,95
II	265	285	1,20
III	285	355	1,37

En conséquence cette substance stable dans son domaine de fusion peut être soumise à des cycles de chauffage–refroidissement.

L'étude thermomicroscopique réalisée antérieurement [5] nous a permis de déceler deux formes cristallines différentes au cours de cycles de chauffage et de refroidissement selon les conditions de retour à la température ambiante.

Les résultats de l'analyse calorimétrique différentielle confirment ceux obtenus par thermomicroscopie.

Par mesure de la transparence les températures de fusion des formes I et II ont été déterminées en fonction de la vitesse de chauffage et de la température de départ.

#### *Produits de recristallisation: résultats*

Le polymorphisme de la khelline ayant été observé au cours de cycles de chauffage–refroidissement, nous avons tenté de déceler l'existence éventuelle de nouvelles formes cristallines.

La recristallisation a été effectuée dans un certain nombre de solvants: acétone, méthanol, propanol, éthanol, chloroforme, acétate d'éthyle, dichlorométhane dans des conditions de température et de pression bien précises.

Les conditions de température sont: -18°C, 20°C, 90°C, sous la pression atmosphérique nous avons également effectué des recristallisations sous pression réduite à 30°C à l'aide d'un rotavapor.

Compte tenu du grand nombre de formes cristallines obtenues au cours des recristallisations, nous avons tenté de les classer en fonction de leur température de fusion et des transformations observées au cours du chauffage.

#### *1. Echantillons de la forme I et échantillons se transformant en cette forme*

Nous rapportons les conditions d'obtention des différentes formes cristallines dont la température de fusion correspond à celle de la forme I;

toutefois, certains échantillons subissent au cours du chauffage des transformations solide–solide.

### Forme I

Les échantillons présentant un comportement thermique identique à celui de la khelline commerciale ont été obtenus dans l'éthanol, le propanol à  $-18^{\circ}\text{C}$  et  $20^{\circ}\text{C}$  dans l'acétate d'éthyle, le chloroforme et le dichlorométhane à  $20^{\circ}\text{C}$ .

Nous rapportons à titre d'exemple les résultats du produit de recristallisation dans l'éthanol à  $20^{\circ}\text{C}$ .

La courbe d'analyse calorimétrique différentielle obtenue (Fig. 2a) révèle la présence d'un seul accident endothermique correspondant à la fusion de la substance, à la température de  $153^{\circ}\text{C}$ .

Lors de l'examen thermomicroscopique (programmé à  $10^{\circ}\text{C min}^{-1}$ ) aucune transformation n'est observée avant la fusion à  $153^{\circ}\text{C}$ .

La courbe de fusion en fonction de la transparence (Fig. 3), obtenue après chauffage de la substance programmée à une vitesse de  $2^{\circ}\text{C min}^{-1}$ , donne une température de fusion à  $153,2^{\circ}\text{C}$ .

Abdallah et al. [6], a obtenu la forme I dans le propanol, et le chloroforme à température ambiante. Ces résultats sont en accord avec nos travaux; des différences apparaissent en ce qui concerne l'acétone et le méthanol.

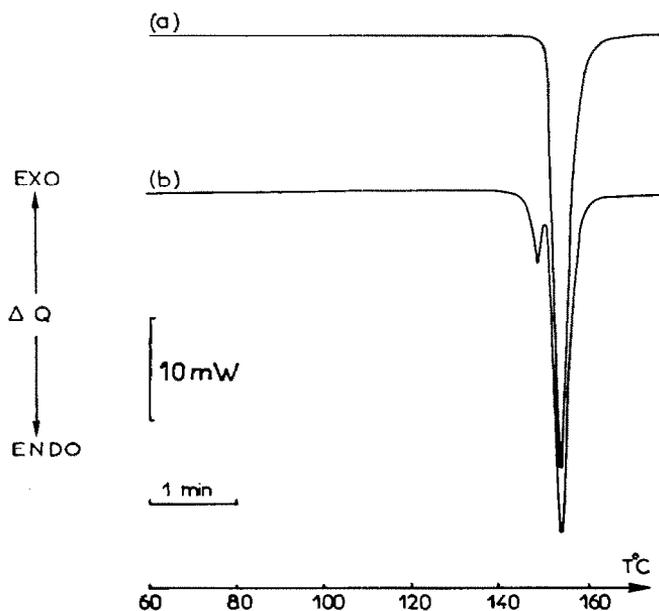


Fig. 2. Courbes d'analyse calorimétrique différentielle de la forme I (a) et de la forme A1 (b). Prise d'essai 2,94 (a); 2,35 (b).

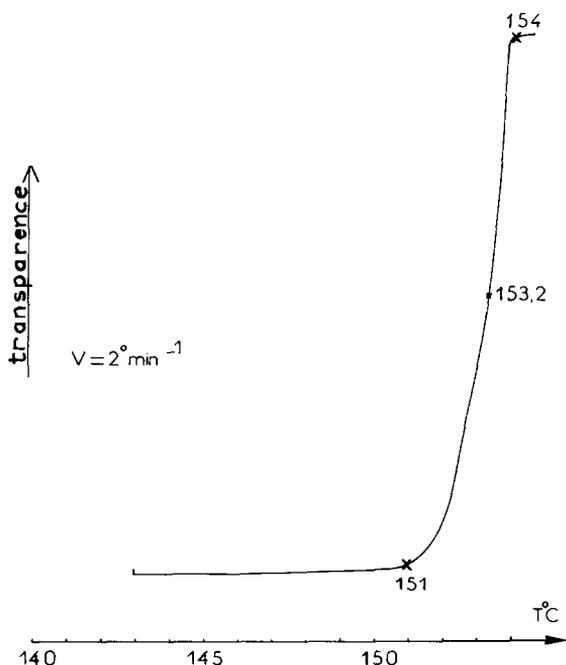


Fig. 3. Cinétique de fusion de la forme I de la khelline en fonction de la transparence.

Dans le cas des produits de recristallisation dans le méthanol, la forme neutre obtenue, instable se transforme en quelques jours en la forme I. Une transformation est observée entre 60 et 80 °C. En utilisant l'acétone à 20 °C nous avons obtenu un mélange de formes; ce cas est développé ultérieurement.

## 2. Échantillons se transformant en la forme I

Quatre échantillons présentent une transformation solide–solide observée au cours du chauffage, puis une fusion à 153 °C.

Ces échantillons, obtenus à  $-10^{\circ}\text{C}$  dans le chloroforme, le dichlorométhane, l'acétone et à  $90^{\circ}\text{C}$  dans l'éthanol, sont appelés respectivement forme: A1, A2, A3 et A4. Les résultats de l'analyse calorimétrique différentielle et thermomicroscopique sont consignés dans le Tableau 2.

Les courbes d'analyse calorimétrique différentielle correspondant aux formes A2, A3 et A4 apparaissent identiques à celle de la forme I: toutefois la ligne de base est légèrement descendante à la sensibilité de 2,0 mW.

Par contre, la forme A1 donne deux accidents endothermiques; le premier correspondant à une transformation solide–solide, observé par thermomicroscopie à  $147^{\circ}\text{C}$ , est de moindre intensité que le deuxième à  $153^{\circ}\text{C}$  (fusion) (Fig. 2b).

En ce qui concerne les formes A2, A3 et A4, l'étude thermomicroscopique permet d'observer à  $20^{\circ}\text{C}$ , la présence de cristaux agglutinés en amas

TABLEAU 2

Résultats de l'analyse calorimétrique différentielle (ACD) et de l'analyse thermomicroscopique (TM) des échantillons se transformant au cours du chauffage en la forme I; ces échantillons sont obtenus par recristallisation sous la pression atmosphérique à  $-18^{\circ}\text{C}$  dans le chloroforme (A1), le dichlorométhane (A2), l'acétone (A3) et à  $90^{\circ}\text{C}$  dans le méthanol (A4)

Formes	Solvants	Conditions d'obtention ( $^{\circ}\text{C}$ )	Transformation $T$ ( $^{\circ}\text{C}$ ) (TM, ACD)	Fusion $T$ ( $^{\circ}\text{C}$ ) (TM, ACD)
A1	Chloroforme	-18	147,0	153,0
A2	Dichlorométhane	-18	40,0-150,0	153,0
A3	Acétone	-18	40,0-150,0	152,6
A4	Méthanol	90	40,0-150,0	152,6

grisâtres. Au fur et à mesure que la température augmente, une luminosité apparaît autour de ceux-ci et s'intensifie progressivement jusqu'à la fusion.

Une transformation faiblement énergétique se produit de  $40^{\circ}\text{C}$  à  $150^{\circ}\text{C}$  pour les formes A2, A3 et A4.

Pour la forme A1, on observe une transformation se traduisant par une modification de forme des cristaux au voisinage de  $147,0^{\circ}\text{C}$ .

La courbe de fusion en fonction de la transparence présente la même allure que celle de la forme I.

La diffraction des rayons X permet d'identifier les formes A1, A2, A3 et A4 et de les différencier de la forme I comme le montre le Tableau 3. Dans ce tableau, ont été sélectionnées les six raies de plus forte intensité du spectre de chacun des échantillons étudiés.

### Forme II

La forme II ( $T_f = 150,3^{\circ}\text{C}$ ), mise en évidence lors d'une étude antérieure [5], est décelée au cours de cycles chauffage-refroidissement, n'a pas été isolée par recristallisation.

Cependant, nous avons noté sa présence dans certains échantillons constitués de mélanges de plusieurs formes.

### 3. Echantillons de la forme III et échantillons se transformant en cette forme

Les produits de recristallisation fondant à  $148,0^{\circ}\text{C}$ , température inférieure à celle de la fusion de la forme II sont appelés forme III.

Ces échantillons présentent un comportement thermique spécifique. En effet, nous observons une fusion totale à  $148,0^{\circ}\text{C}$  suivie d'une recristallisation en cristaux prismatiques qui fondent à leur tour entre  $152$  et  $153^{\circ}\text{C}$ .

La courbe d'analyse calorimétrique différentielle présente deux accidents endothermiques d'intensité différente (Fig. 4).



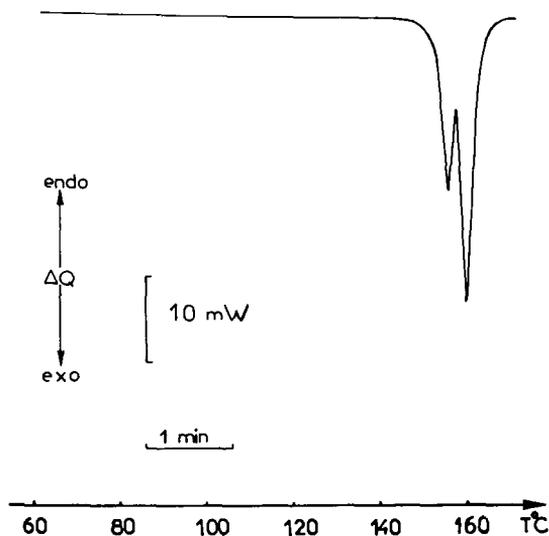


Fig. 4. Courbe d'analyse calorimétrique différentielle de la forme **III** de la khelline. Prise d'essai 2,54 mg.

Nous avons obtenu la forme **III** sous pression réduite dans le méthanol et l'acétate d'éthyle à 30°C.

Les cristaux de la forme **III** donnent une courbe d'analyse calorimétrique différentielle présentant deux accidents endothermiques à 148°C et 152°C.

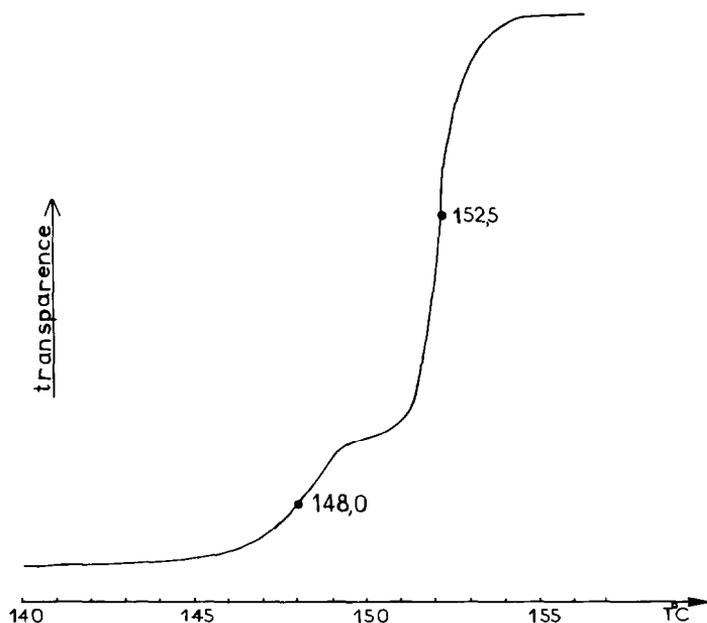


Fig. 5. Cinétique de fusion de la forme **III** de la khelline en fonction de la transparence.

(Fig. 4). Ceux-ci correspondent aux deux fusions intervenant au cours du chauffage.

Les échantillons se présentent avant chauffage sous la forme de petites aiguilles lors de l'examen thermomicroscopique. La première fusion des cristaux intervient à  $148,0^{\circ}\text{C}$ . Elle est suivie d'une recristallisation en prismes fondant à  $152,2^{\circ}\text{C}$ .

La courbe de fusion en fonction de la transparence met en évidence l'existence d'une fusion en deux temps, toutefois la recristallisation est masquée par la 1ère fusion (Fig. 5).

La forme **III** décrite correspond à la forme **II** décelée par Abdallah et al. [6], toutefois les conditions d'obtention diffèrent. Les auteurs précédents l'ont obtenue à  $100^{\circ}\text{C}$ ; quant à nous, nous l'avons mise en évidence sous pression réduite.

### *Echantillons se transformant en la forme **III***

Ces échantillons présentent une transformation des cristaux intervenant avant la première fusion à  $148^{\circ}\text{C}$ . La courbe d'analyse calorimétrique différentielle présente toujours les deux accidents fortement endothermiques (double fusion) et une légère transformation endothermique faiblement énergétique.

Nous désignons ces divers échantillons par la lettre B. Ils sont obtenus dans l'éthanol à  $90^{\circ}\text{C}$  sous la pression atmosphérique (B1), dans le chloroforme (B2) et dans l'acétone (B3) à  $30^{\circ}\text{C}$  sous pression réduite.

L'examen thermomicroscopique de ces échantillons permet de visualiser les transformations intervenant avant la première fusion, l'analyse calorimétrique s'avérant insuffisante à ce niveau car celles-ci sont très faiblement énergétiques. Par ailleurs, cette transformation n'avait pas été décelée antérieurement.

En règle générale, est observée une évolution de la forme des cristaux au cours du chauffage, se faisant de manière progressive et continue jusqu'à la première fusion. Les températures auxquelles interviennent ces transformations varient en fonction des formes: de  $130,0^{\circ}\text{C}$  à  $146^{\circ}\text{C}$  pour B1, de  $80,0^{\circ}\text{C}$  à  $147,0^{\circ}\text{C}$  pour B2 et de  $100,0^{\circ}\text{C}$  à  $145^{\circ}\text{C}$  pour B3.

La suite de l'examen permet d'observer une première fusion à  $148^{\circ}\text{C}$ . Dans les globules liquides apparaissent alors des cristaux prismatiques fondant à  $153^{\circ}\text{C}$ .

Les courbes de fusion en fonction de la transparence de ces échantillons ont une allure similaire à celle qui est représentée Fig. 5. Ce résultat est prévisible car cette méthode ne rend pas compte des transformations solide-solide.

Les résultats des divers échantillons présentant le phénomène de double fusion, précédé parfois de transformations solide-solide, sont consignés dans le Tableau 4.

Ces transformations observées dans le cas des formes B1, B2 et B3

TABLEAU 4

Résultats de l'analyse calorimétrique différentielle (ACD) et de l'analyse thermomicroscopique (TM) des échantillons de la forme III et de ceux se transformant en la forme III au cours du chauffage B1, B2 et B3 obtenu par recristallisation respectivement dans l'éthanol (90 °C, pression atmosphérique), le chloroforme (30 °C pression réduite) et l'acétone (30 °C pression réduite)

Formes	Solvants	Transformation $T$ (°C) (TM, ACD)	Fusion		Recris- tallisation $T$ (°C)
			$T$ (°C)		
			1°	2°	
III	Méthanol	–	148,0	152,0	149,0
			–	148,5	152,4
B1	Ethanol	130,0 à 146,0	149,0	153,0	149,5
B2	Chloroforme	80,0 à 147,0	149,5	153,0	150,0
B3	Acétone	100,0 à 145,0	148,0	153,0	149,0

faiblement énergétiques ne peuvent être mises en évidence par analyse calorimétrique différentielle, qu'en utilisant une grande sensibilité. D'autre part, la thermomicroscopie permet de déceler et visualiser les différences de comportement de ces produits. Il est possible des les identifier par diffraction de rayons X.

Nous rapportons à titre d'exemple les six raies les plus importantes obtenues pour la forme III, B1 et B3 (Tableau 5).

#### Forme IV

Au cours de ce travail, nous avons décelé une nouvelle forme qui fond à 145 °C. Nous l'avons appelée forme IV.

Cependant, elle n'a pas été isolée, les échantillons qui nous ont permis de la trouver étant constitués d'un mélange de formes (obtenues dans le chloroforme et le dichlorométhane à 90 °C).

TABLEAU 5

Résultats de l'étude par diffraction de rayons X; valeurs des angles de diffraction  $\theta$ , des distances réticulaires  $d$  (Å), des rapports des intensités  $I_0/I$  des formes III, B1 et B3

Forme III			B1			B3		
$\theta$	$d$	$I_0/I$	$\theta$	$d$	$I_0/I$	$\theta$	$d$	$I_0/I$
5,20	8,50	100	4,67	9,46	56	4,76	9,28	10
5,95	7,43	17	4,72	9,38	69	5,17	8,54	100
10,55	4,20	18	5,04	8,77	100	5,94	7,44	12
12,48	3,56	47	12,29	3,62	92	10,48	7,23	14
12,58	3,53	40	12,37	3,59	79	12,44	3,57	29
12,92	3,44	18	12,75	3,49	40	12,88	3,45	10

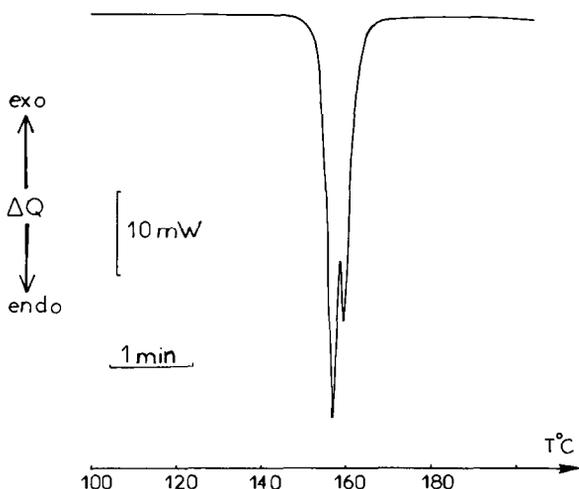


Fig. 6. Courbe d'analyse calorimétrique différentielle des formes I et II associées lors de recristallisation. Prise d'essai 2,70 mg.

### *Mélange de formes*

Un certain nombre d'échantillons présentent la particularité d'être constitués de plusieurs formes. Leur comportement thermique, en toute logique plus complexe que pour les composés étudiés précédemment, est, de ce fait, plus difficilement interprétable.

Pour chacun de ces cas, nous observons au moins une fusion partielle au cours du chauffage, précédée ou suivie de diverses transformations solide-solide selon les cas.

#### *Mélange forme II + forme I*

Obtenus dans l'acétone à 90°C, l'acétate d'éthyle à -10°C sous la pression atmosphérique, sous pression réduite à 30°C dans le dichlorométhane, ces échantillons présentent une fusion partielle à 150°C et totale à 153°C (Fig. 6). Aucune transformation n'a été observée au cours des examens thermomicroscopiques.

#### *Mélange forme III + forme I*

Les échantillons recueillis après recristallisation dans le propanol à 90°C, l'acétone à 20°C, l'éthanol et le propanol sous pression réduite présentent une fusion partielle à 148°C devenant totale à 153°C. Il n'a pas été décelé de transformation solide-solide au cours du chauffage.

#### *Mélange de forme se transformant au cours du chauffage en forme IV + forme I*

Par recristallisation dans le dichlorométhane à 90°C l'échantillon se transforme de façon continue au cours du chauffage, jusqu'à la fusion partielle à 145°C, la fusion totale intervient à 152,5°C.

*Mélange de formes se transformant au cours du chauffage en forme IV + forme II*

L'échantillon provenant de la recristallisation dans le chloroforme à 90 °C subit des transformations solide-solide à partir de 137 °C. Un début de fusion intervient vers 145 °C, la fusion totale entre 150 et 151 °C.

## CONCLUSION

Nous avons identifié des formes cristallines différentes de celle de la khelline commerciale par les méthodes thermoanalytiques et par diffraction de rayons X. Ces formes ont été obtenues par recristallisation dans divers solvants dans des conditions de température et de pression différentes.

Nous avons décelé des formes polymorphes nouvelles de la khelline, la forme III ( $T_f$  147,5 °C), la forme IV ( $T_f$  145 °C) associée à la forme II et la forme I; nous avons également identifié quatre formes se transformant au cours du chauffage en la forme I et trois formes en la forme III.

La khelline, de par sa formule chimique, est susceptible de former des liaisons hydrogène intermoléculaires prenant naissance au cours des recristallisations. L'influence de la nature du solvant, de la température et de la pression a été mise en évidence. La forme I ( $T_f$  153,0 °C) la plus stable correspondant à la forme commerciale est obtenue sous la pression atmosphérique à 20 °C dans la plupart des solvants envisagés.

## BIBLIOGRAPHIE

- 1 A. Chauvet, Contribution à l'étude du comportement thermique de substances psychotropes et de leur interaction à l'état solide, Thèse d'Etat ès Sciences Pharmaceutiques, Montpellier, 1983.
- 2 J. Masse, A. Chauvet, G. de Maury et A. Terol, *Thermochim. Acta*, 96 (1985) 189.
- 3 G. de Maury, A. Chauvet, A. Terol et J. Masse, *Thermochim. Acta*, 97 (1986) 127.
- 4 A. Terol, J. Masse, P. Chevalet et H. Orzalesi, *Thermochim. Acta*, 107 (1986) 189.
- 5 J. Masse, R. Malaviolle et A. Chauvet, *J. Thermal. Anal.*, 16 (1979) 341.
- 6 O. Abdallah, S. Abd El Fattah et E. Abd El Azim, *Acta. Pharm. Technol.*, 4 (1983) 309.
- 7 J.P. Beale, *Cryst. Struct. Commun.*, 1 (1973) 125.
- 8 S.M. Salem, A.M. Abd El Rahim, N.A. Ahmed et M.A. El Hiti, *Egypt. J. Phys.*, 1 (1984) 121.
- 9 R.A. Baxter, A scanning microcalorimetry cell based on a thermoelectric disc—Theory and Applications, dans R.F. Schwenker, Jr., et P.D. Garn (Eds.), *Thermal Analysis*, Vol. 1, Academic Press, New York, 1969, p. 65.