



RTG difrakční metody a jejich aplikace ve farmacii

Bohumil Kratochvíl

Farmaceutická fakulta VFU Brno

Pevnolátkové analytické metody používané ve farmacii

PXRD - Powder X-Ray Diffraction

SCXRD - Single Crystal X-Ray Diffraction

ssNMR - Solid State Nuclear Magnetic Resonance

DSC - Differential Scanning Calorimetry (HyperDSc, MicroDSC)

MTDSC - Modulated Temperature Differential Scanning Calorimetry

IR - mid-Infrared Spectroscopy

NIR - Near-Infrared Spectroscopy

TGA - Termogravimetric Analysis

DVS - Dynamic Vapour Sorption

FTIR - Fourier Transform Infrared

TPS - Terahertz Pulsed Spectroscopy

IMC - Isothermal Microcalorimetry

PLM - Polarised Light Microscopy

MS - Mass Spectroscopy

TSC - Thermally Stimulated Current

TEM, SEM, HRTEM - Transmission (Scanning, High Resolution) Electron Microscopy

AFM - Atomic Force Microscopy

STM - Scanning Tunelling Microscopy

RS - Raman Spectroscopy

IMC - Isothermal Microcalorimetry

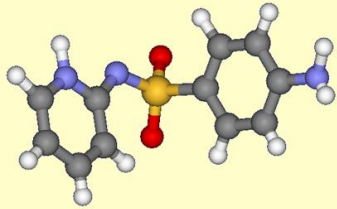
DRIFTS - Diffuse Reflectance Infrared Transmission Spectroscopy

EXAFS - X-Ray Absorption Fine Structure

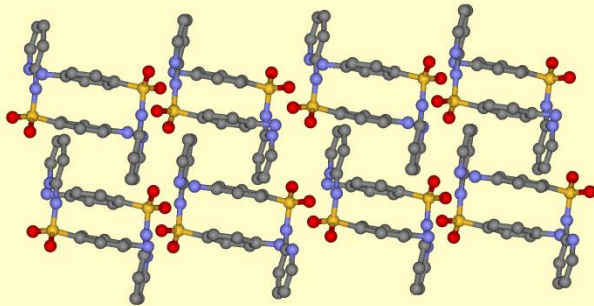
XANES - X-Ray Absorption Near Edge Structure

SAXS - Small Angle X-Ray Scattering

Rozdělení pevnolátkových analytických metod



metody analyzující molekuly: RTG difrakce, IR, NIR a Ramanova spektr., pevnolátková NMR, hmotnostní spektroskopie (MS)



metody analyzující krystalovou (amorfní) strukturu: RTG difrakce (prášková, monokrystalová), teplotní metody (TGA, DSC, mikroDSC, hyperDSC, kalorimetrie (SC, TSC, IMC), pokročilé mikroskopie (TEM, SEM, AFM, HRTEM, STM), terahertzová spektr., RTG absorpční spektr. (EXAFS, XANES), malouhlový rozptyl (SAXS)



metody analyzující „bulk“ (povrch, velikost a tvar částic, sytné a filtrační charakteristiky, hygroskopicitu...): optická mikroskopie (v polarizov. světle, teplotní), dynamická sorpce par (DVS), síťová analýza, laserová difrakce, zeta potenciál, měření adsorpčních izoterem, RTG difrakce

Přístrojové zázemí v ČR a SR pro metodiku RTG difrakce

PXRD - Powder X-Ray Diffraction (RTG prášková (fázová) analýza)

SCXRD - Single Crystal X-Ray Diffraction (RTG monokrystalová (strukturní) analýza)

RTG prášková (fázová) analýza:

- rutinní technika nejenom ve farmaceutických laboratořích - RTG práškový difraktometr (v ČR a SR v provozu okolo 150 přístrojů)
- hlavní výrobci: Bruker, PanAnalytical, Rigaku (cena okolo 150 tis. EUR)

RTG monokrystalová (strukturní) analýza:

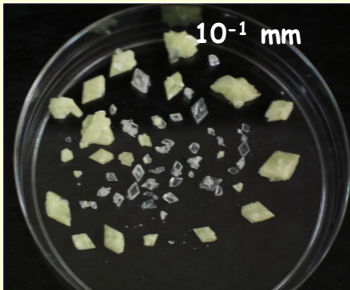
- náročná technika, v ČR a SR nemá žádná farmaceutická firma - RTG monokrystalový difraktometr (v ČR a SR v provozu asi 10 přístrojů)
- hlavní výrobci: Bruker, Agilent (Oxford Diffraction), Rigaku (cena okolo 550 tis. EUR)

RTG difrakční metody používané ve farmaceutickém průmyslu

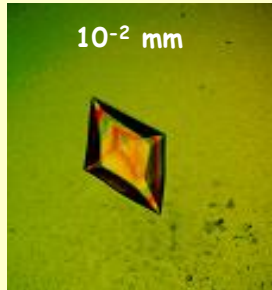
Typ měřeného materiálu

Monokrystalové metody

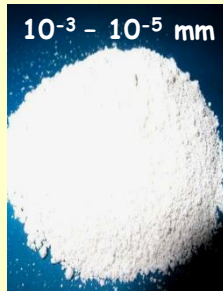
Práškové (polykrystalické) metody



malé molekuly



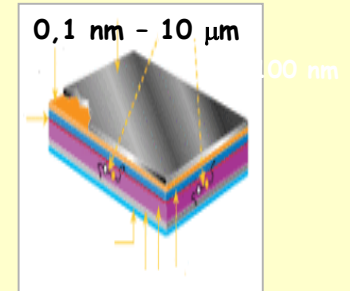
biomakromolekuly



prášek

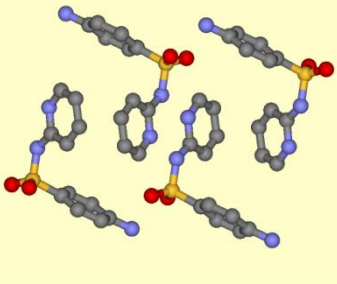


kompaktní těleso

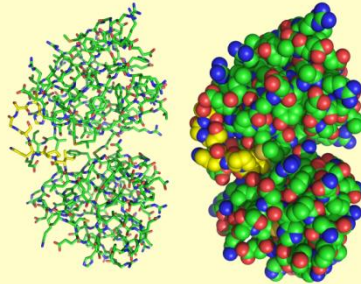


tenká vrstva

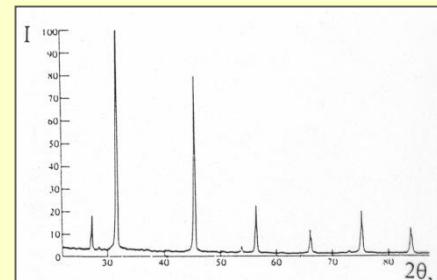
Výstup



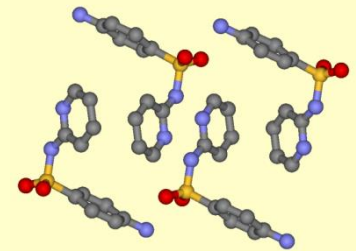
strukturní analýza



strukturní analýza



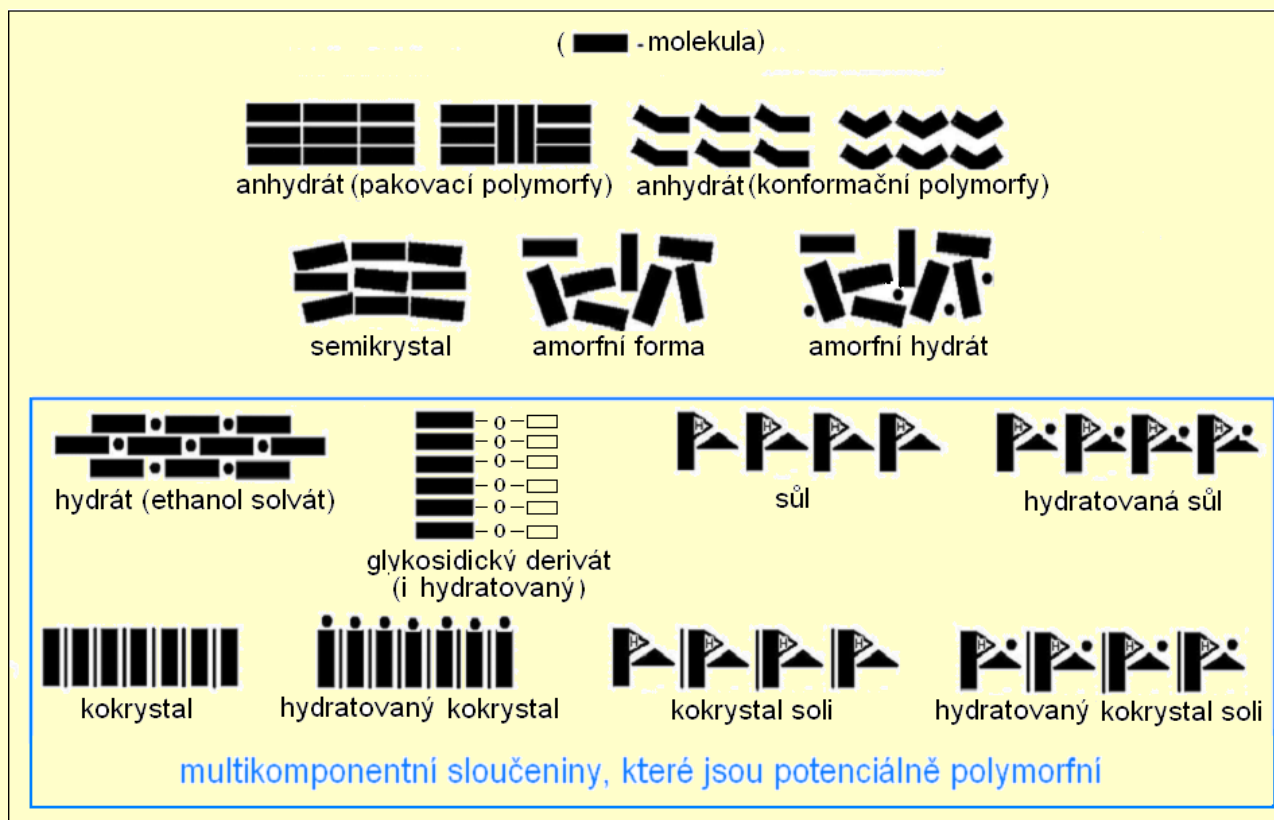
fázová analýza, ale i strukturní analýza



Farmaceutické materiály - chemické a fyzikální typy pevných léčivých látek



pevná substance
(léčivá látka)



Jedna farmaceutická molekula může tvořit více než 100 různých pevných substancí

Farmaceutické materiály - pevné lékové formy (tablety, tobolky, dražé, čípky)

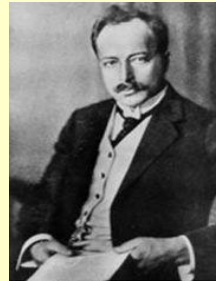
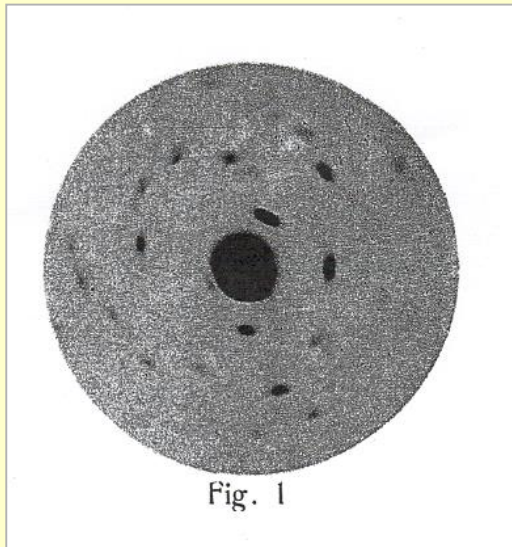


Nejčastěji zkoumané jevy a procesy v pevných substancích a v pevných lékových formách metodami RTG difrakce

- Monitorování fázového složení farmaceutických prášků, reprodukovatelnost šarží
- „Screening“ hydrátů a solvátů a procesů dehydratace a desolvatace
- Identifikace a stanovení polymorfů a studium polymorfních transformací
- Amorfní fáze a jejich transformace na krystalické fáze, stupeň krystalinity
- Farmaceutické soli, kokrystaly a jejich příprava
- Monitorování stability, degradačních procesů a strukturní charakterizace pevných degradačních produktů
- Stanovení technologických parametrů prášků, segregační chování směsí
- Analýza homogenity (mikrostruktury) kompaktních lékových forem (tablety, tobolky)
- Farmaceutická dokumentace, expertní posouzení při patentových sporech

Krátký pohled do historie RTG difrakce

1912: Laue, Friedrich, Knipping – objevili difraci RTG záření na krystalických látkách



M. von Laue

1912-22: W.L. Bragg & W.H. Bragg – vyřešili struktury jednoduchých anorganických a organických sloučenin:

diamant, grafit, měď, chlorid sodný a draselný, sfalerit, fluorit, pyrit, vápenec, korund, spinel, led, naftalen



W. L. Bragg

První RTG difraktogram krystalu modré skalice

Friedrich W., Knipping P., Laue M.: Ann.d. Physik 41, 971 (1913).

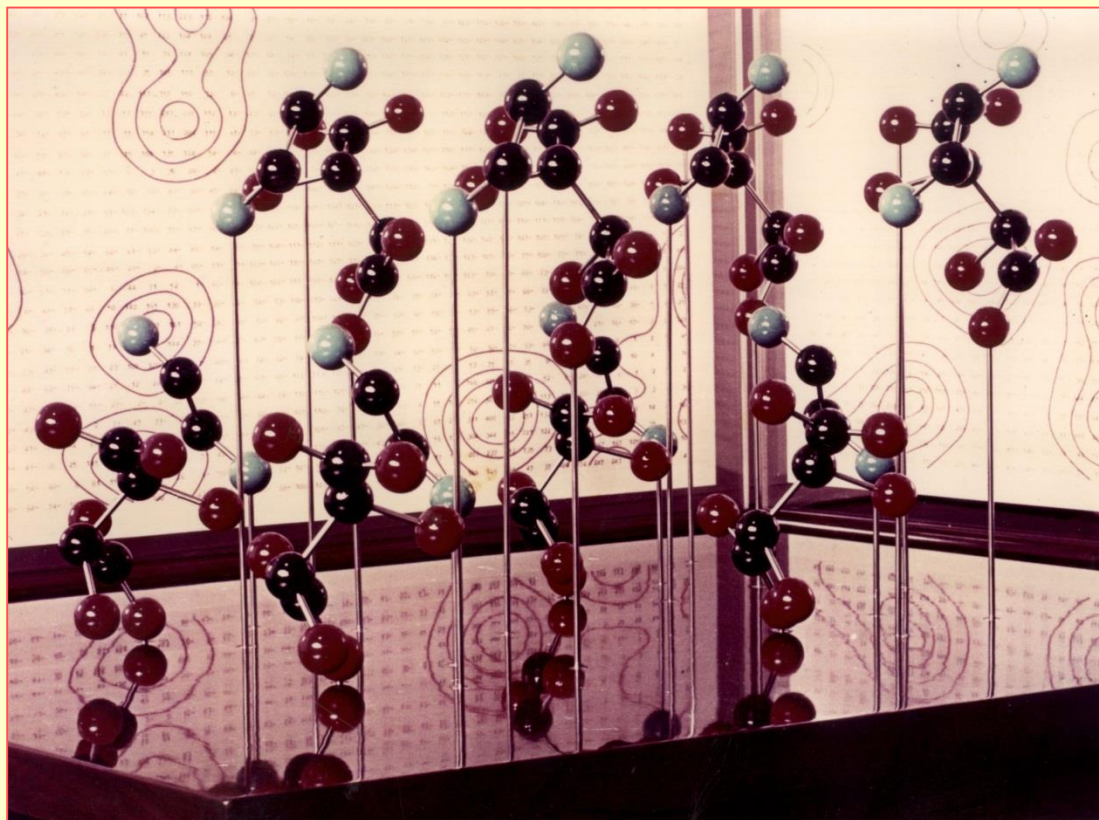
$$n\lambda = 2d \sin \theta$$

Braggova rovnice

Historie RTG strukturní analýzy v ČR

První krystalová struktura byla vyřešena v letech 1951-1957

Dr. Allan Línek (fyzik)

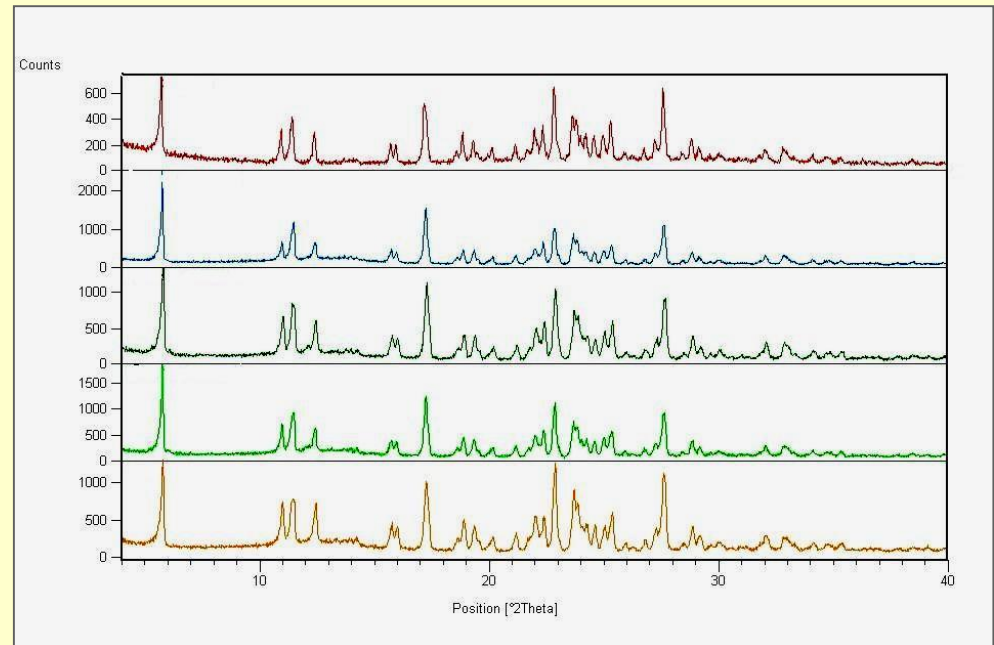
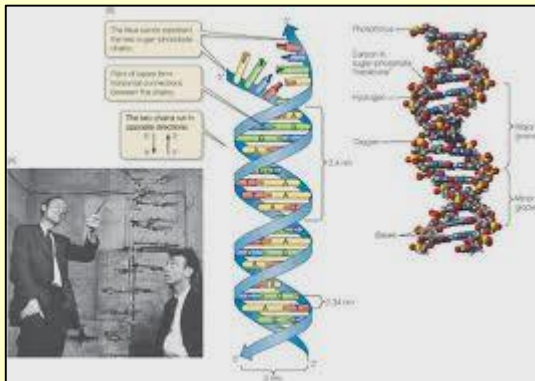
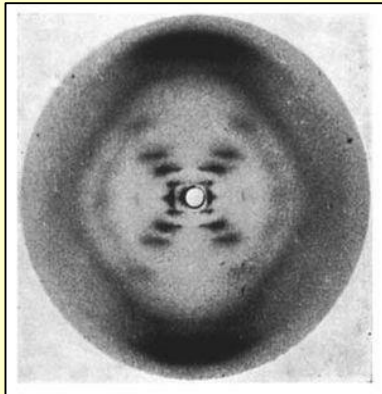


Ethylenediammonium - tartrate (EDT), model struktury byl vystaven na EXPO1958 v Bruselu (N-modrý, O-červený, C-černý)

Krátká historie používání RTG difrakčních metod ve farmacii a lékařství

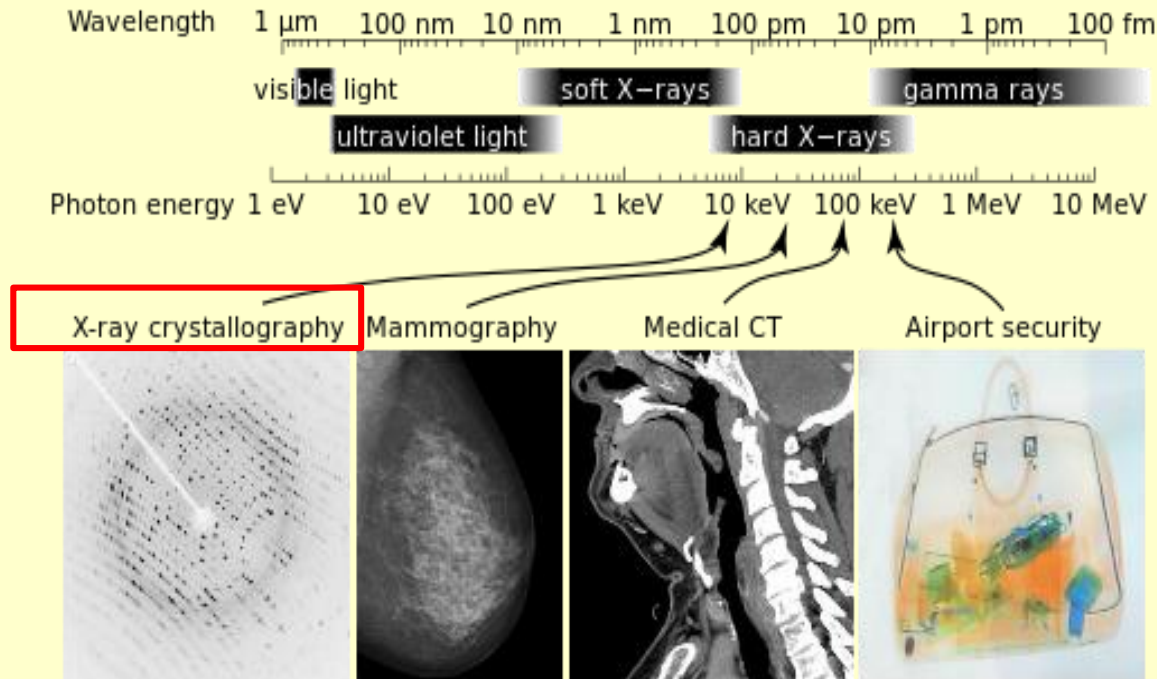
~ 1950: Franklin, Crick, Watson
- RTG difraktogram DNA
(struktura dvojité šroubovice)

~ 1950: Farmaceutické společnosti začaly
využívat RTG práškovou metodu pro
kontrolu fázové čistoty výrobních šarží



Difraktogramy výrobních šarží jednoho produktu
- je prokázána reprodukovatelnost výroby

RTG záření

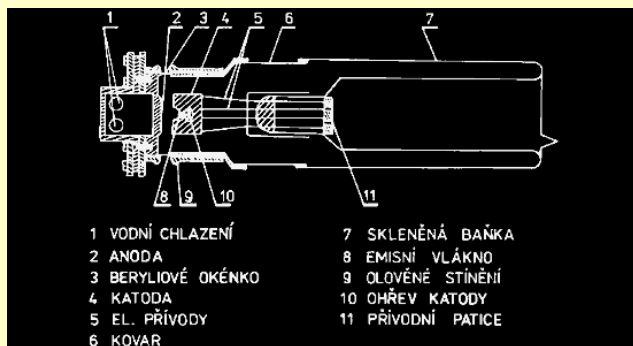


$1 \text{ pm} = 10^{-12} \text{ m} = 0,001 \text{ nm}$, $1 \text{ \AA} = 10^{-10} \text{ m} = 0,1 \text{ nm}$, $1 \text{ nm} = 10^{-9} \text{ m}$

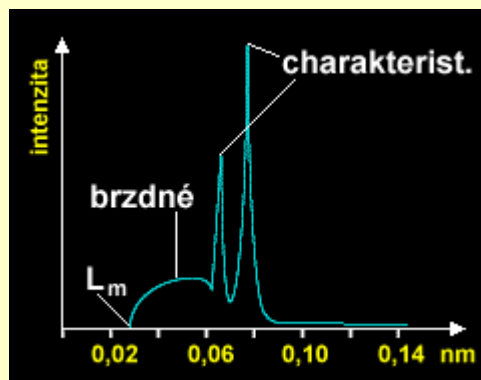
Vlnová délka RTG záření je srovnatelná se vzdálenostmi atomů (rozptylujících center) ve struktuře krystalu - proto může vzniknout pozorovatelný difrakční obraz, který analyzujeme

Zdroje RTG záření

Laboratorní zdroj

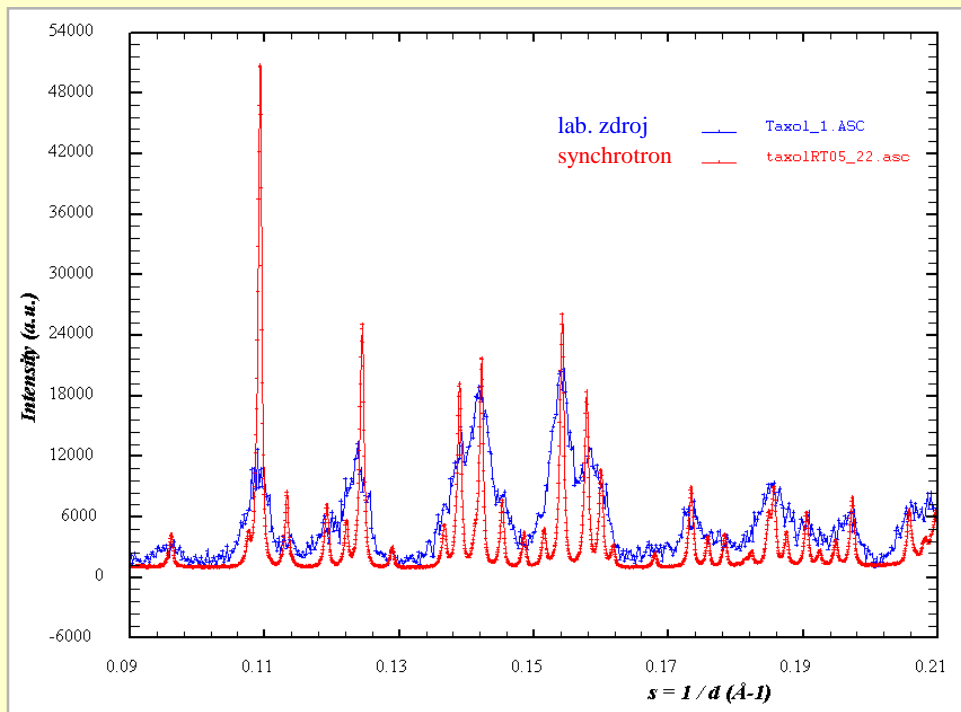


RTG lampa

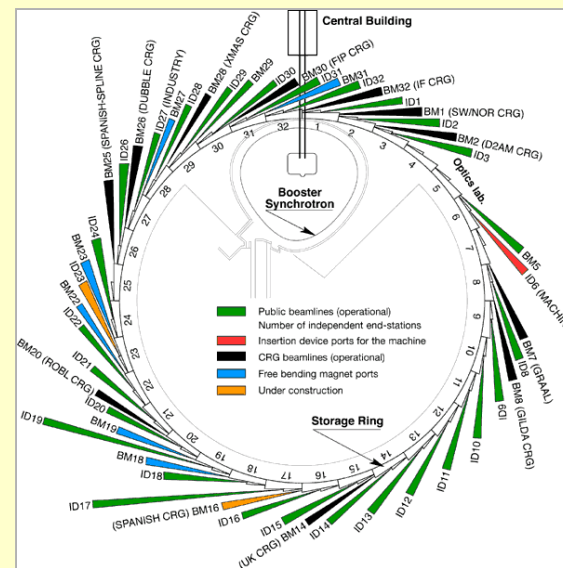


Anoda	Vlnové délky (pm)			Budící napětí(kV)
	$K\alpha_1$	$K\alpha_2$	$K\alpha^*$	
Cu	154,056	154,439	154,184	8,98
Mo	70,930	71,359	71,073	20,00
Co	178,897	179,285	179,026	7,71
Fe	193,600	193,998	193,736	7,11

Synchrotronové záření v oblasti RTG pro difrakční experimenty (0,1 - 5 Å)

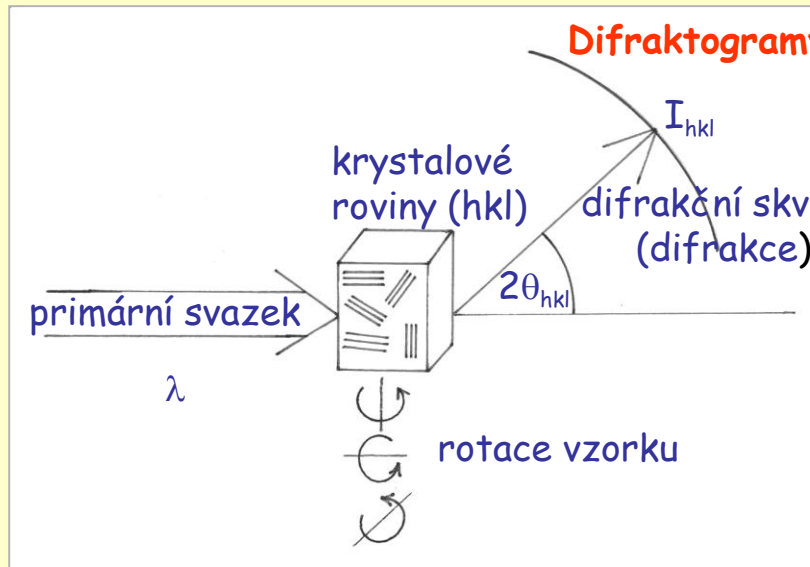


Srovnání kvality experimentální dat při difrakci z laboratorního zdroje a ze synchrotronu

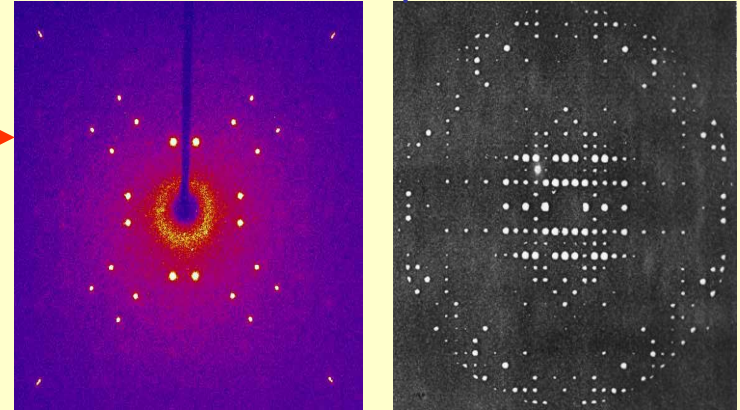


Synchrotron X-ray source ESRF Grenoble

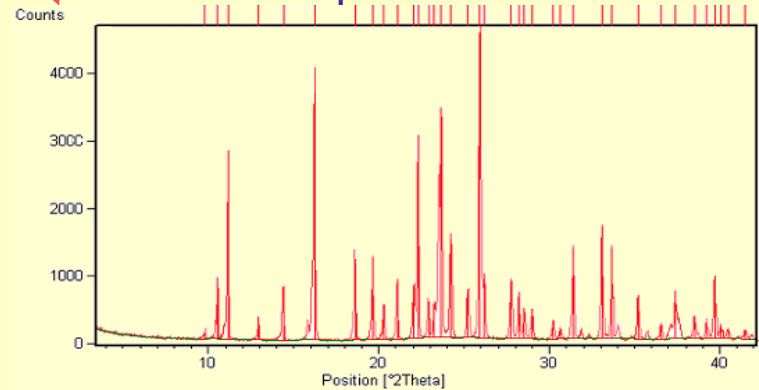
RTG difrakční experiment a difrakční obrazce (difraktogramy) - nikoliv atomy !



monokrystal



prášek



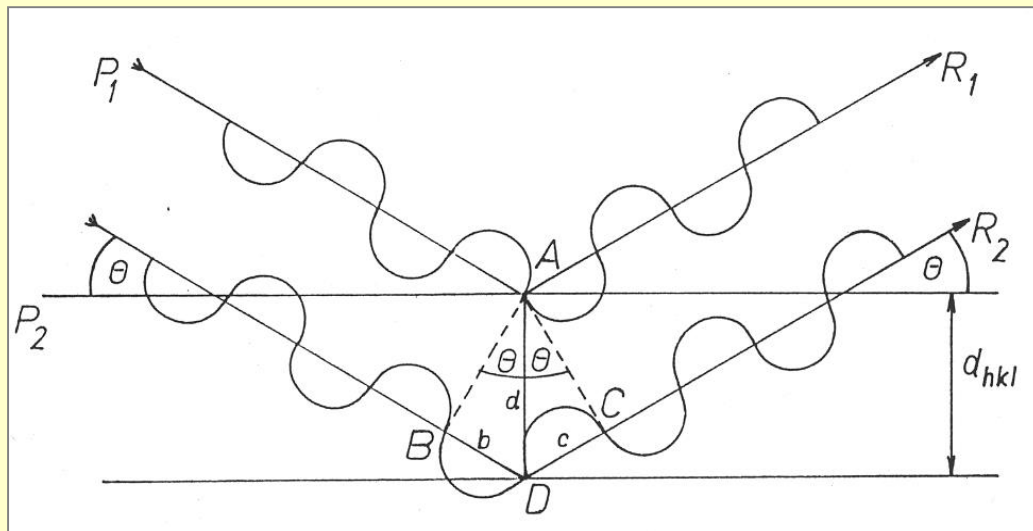
Analyticky využitelné veličiny:

Difrakční intenzita, I_{hkl}
Pozice difrakce, $2\theta_{hkl}$



Různé podoby difraktogramů

Interpretace RTG difraktogramu - difrakce je reflexe

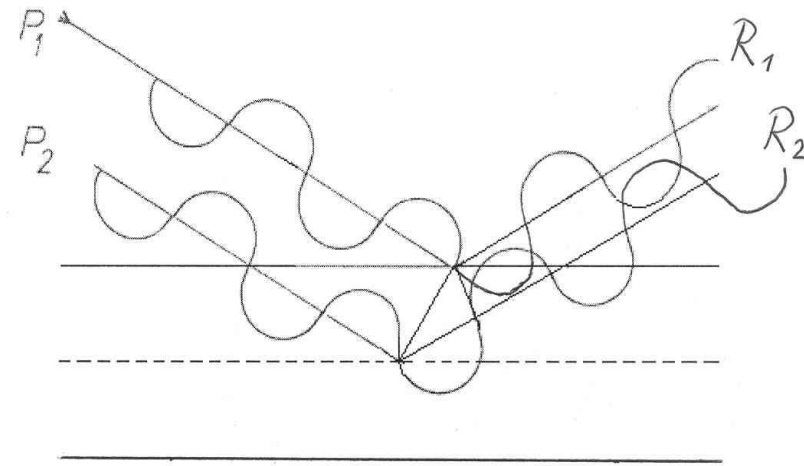


Konstruktivní interference - reflexe nevyhasne, protože R_1 a R_2 jsou ve fázi

$$n\lambda = 2d \sin \theta$$

$$\lambda = 2d \sin \theta$$

řád reflexe n je zahrnut do d



Destruktivní interference - reflexe vyhasne, protože R_1 a R_2 jsou v protifázi

Energie primárního RTG svazku je krystalem rozptýlena (reflektována) pouze do určitých směrů (zatímco v jiných vyhasne)

RTG difrakční experiment „vidí“ (prostřednictvím difrakčního obrazu) strukturu pevné fáze

Struktura: elektronová, molekulová, krystalová (amorfní), mikrostruktura (kompaktní tělesa), charakteristiky sypkého práškového „bulku“

Struktura vs. Vlastnosti

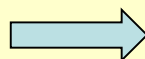
Každá pevná forma má jiné vlastnosti (funkční a technologické parametry) a pouze změnou struktury formy lze tyto vlastnosti měnit !

Vnitřní struktura - nejdůležitější fenomén pevné fáze

Struktura (dimenzionální hierarchie):

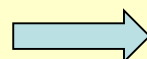
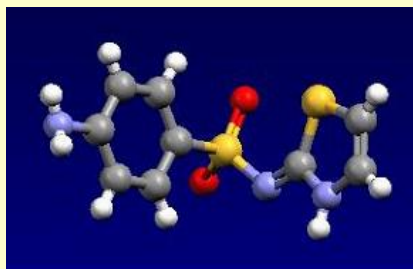
- elektronová ($< 10^{-10}$)
- molekulová ($10^{-10} - 10^{-9}$ m)
- krystalová, amorfní ($10^{-8} - 10^{-6}$ m)
- charakteristiky sypkého práškového „bulku“ ($10^{-5} - 10^{-3}$ m)
- mikrostruktura kompaktního tělesa ($10^{-5} - 10^{-3}$ m)

Elektronová struktura:



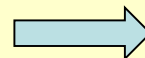
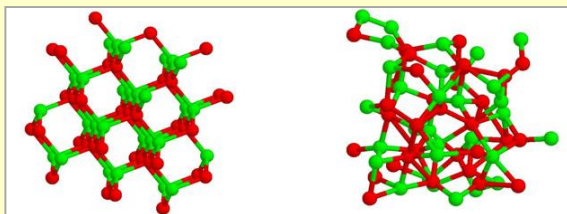
Pásová teorie pevných látek - viz přednáška: Chemie a fyzika pevných látek, pro farmacii méně důležitá

Molekulová struktura:



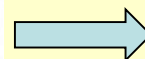
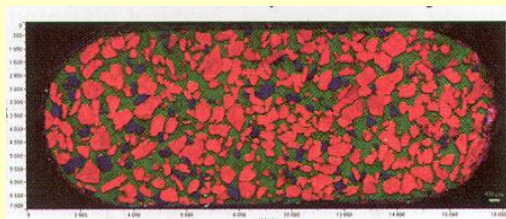
Viz dále, Pro farmacii důležitá!

Krystalová nebo amorfní struktura:



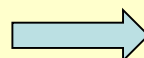
Viz dále, pro farmacii velmi důležité!

Mikrostruktura kompaktních lékových forem:



Pro farmacii důležitá – homogenita lékových forem !

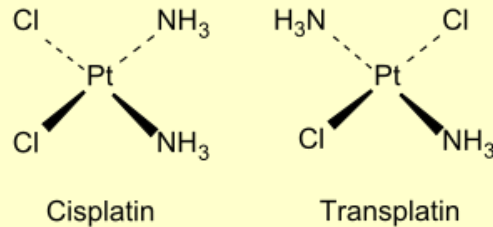
Charakteristiky sypkého práškového bulku



Viz přednáška: Inženýrství farmaceutických výrob, pro farmacii důležité!

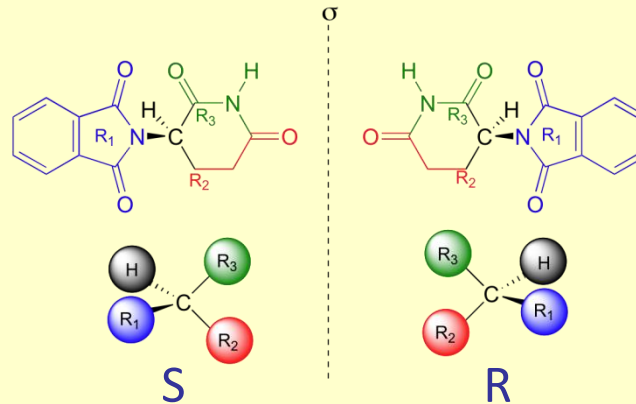
Molekulová struktura

- Isomerie cis, trans



jako kancerostatikum účinkuje
pouze forma cis

- Chiralita



thalidomid: S- isomer teratogen,
R-isomer sedativum

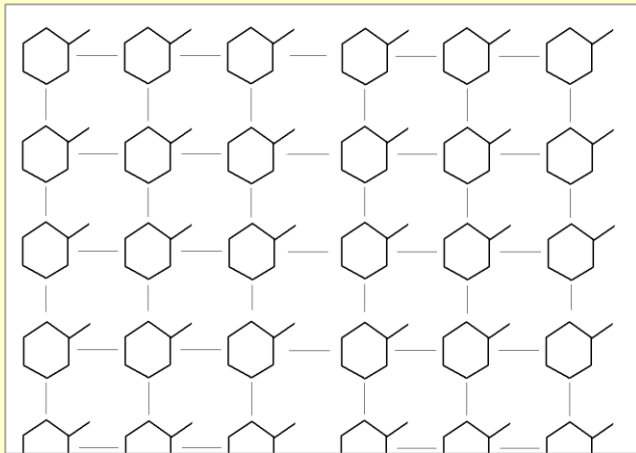
- kontrola správné chirality vstupních surovin
- kontrola zda při mnohastupňových organických syntézách nedochází k nečekané změně chiralita meziprojektu (finálního produktu)
- kontrola, zda při stereoselektivní syntéze nedochází k racemizaci meziprojektu (produktu)
- lokalizace příp. změny chiralita u molekul s více chirálními centry

Krystalické a amorfní fáze

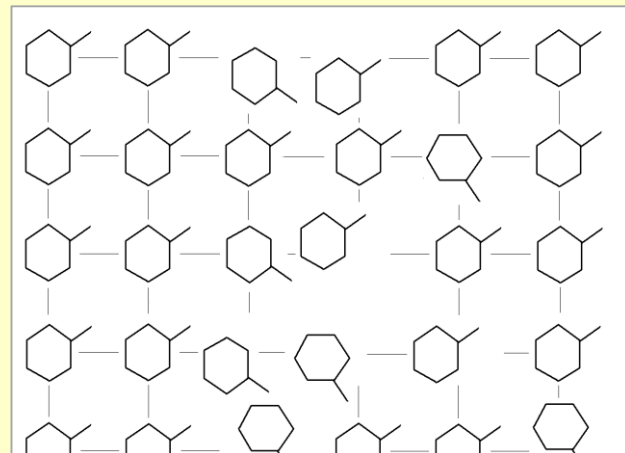
Makroskopické vlastnosti API jsou určeny mírou vzájemné uspořádanosti molekul (vnitřní strukturou API)

- **Krystalické API** mají vnitřní krystalickou strukturu uspořádanou na dlouhou vzdálenost (zhruba nad 100 Å, 1Å = 10⁻¹⁰ m)

- **Amorfní API** mají vnitřní strukturu uspořádanou pouze na krátkou vzdálenost (zhruba pod 100 Å)

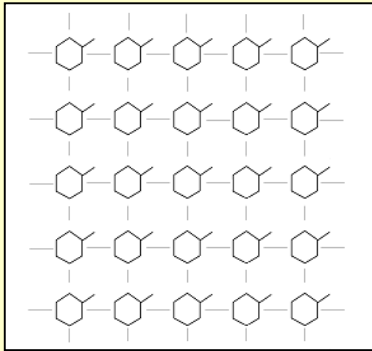


Krystalická fáze



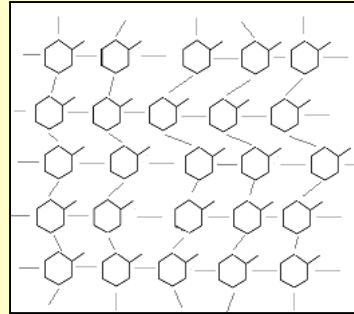
Amorfní fáze

Semikrystalické API



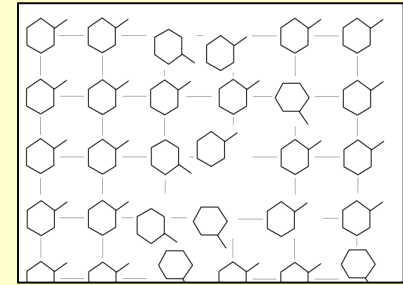
forma **krystalická**
LRO (long-range order)

neostrá hranice!

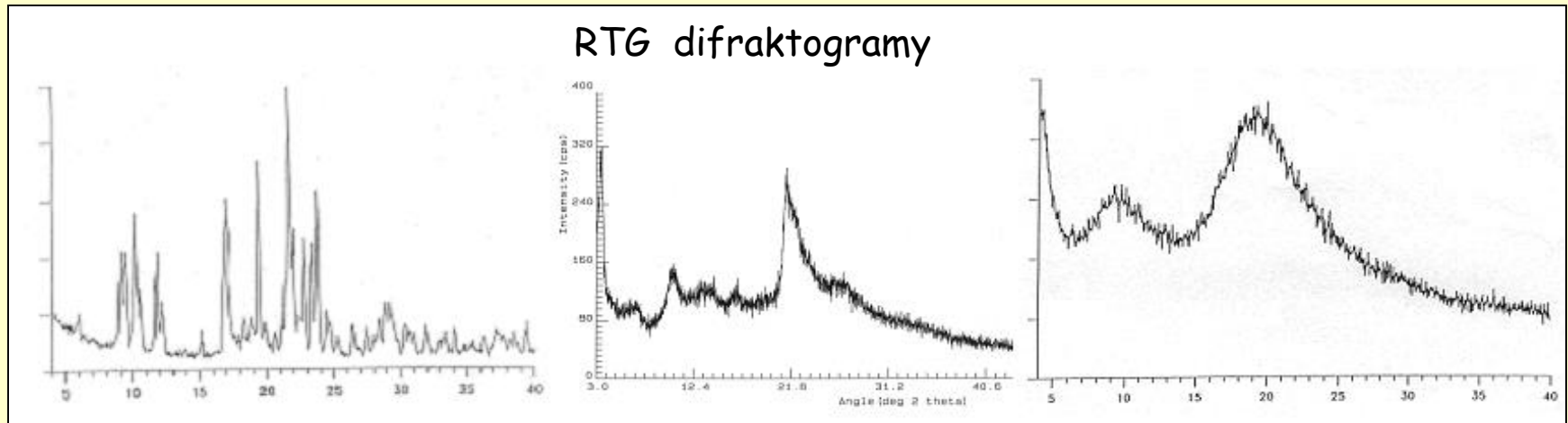


forma **semikrystalická**

neostrá hranice!



forma **amorfní**
SRO (short-range order)

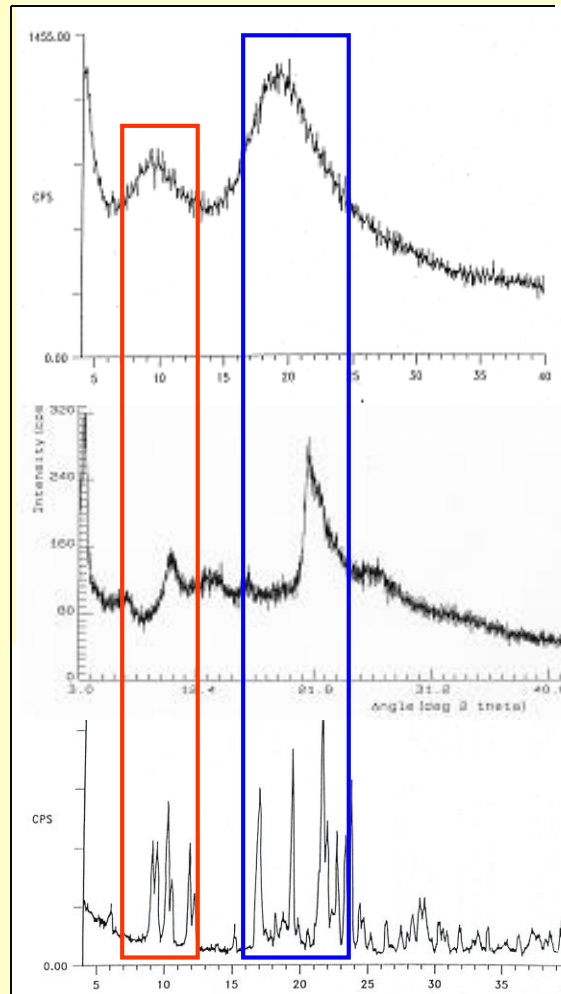


← Samovolný proces

Amorfní a semikrystalické API jsou fázemi nestabilními (výše energetickými) a proto přechází na fáze krystalické (níže energetické)

Amorfní, semikrystalické a krystalické fáze

RTG difraktogramy:



atorvastatin vápenatý amorfát

atorvastatin vápenatý
semikrystal, forma V, firma Teva

atorvastatin vápenatý . 3H₂O krystal,
forma I , firma Warner-Lambert (Pfizer)

**Semikrystalická fáze může tvořit mezistupeň při fázové transformaci :
Amorfát → Semikrystalická fáze → Krystal**

Základní charakteristika a rozdíl mezi krystalickou a amorfni fází

Krystalická fáze:

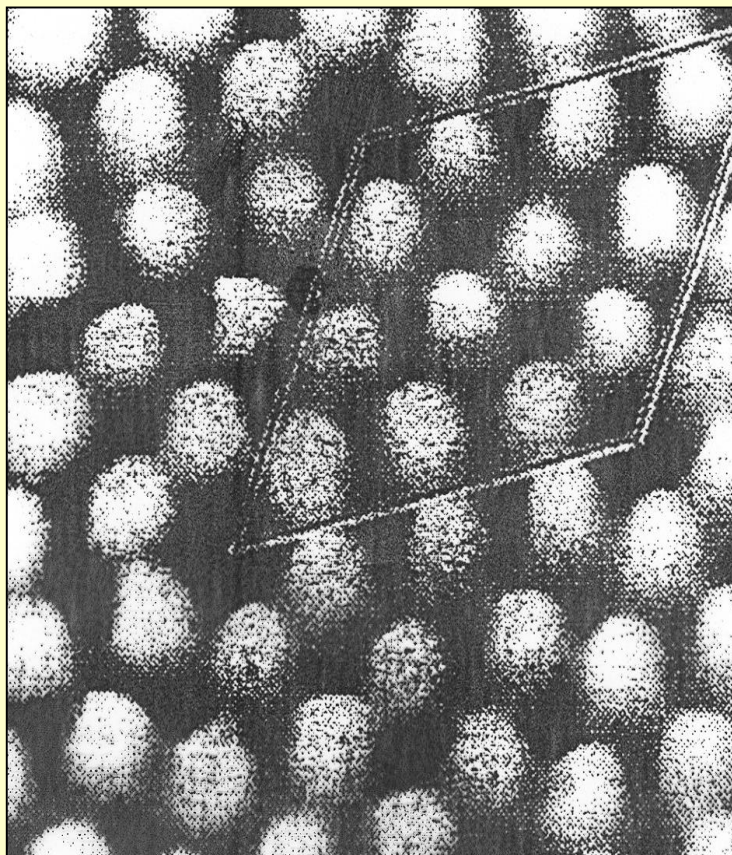
- ostrý bod tání, T_t
- parametry krystalové (vnitřní) struktury:
- **mřížkové parametry**, délky hran buňky a, b, c [Å] a jimi sevřené úhly α, β, γ [°], **mezirovinné vzdálenosti** d_{hkl} ,
- **prostorová grupa symetrie**
- **pozice atomů** x, y, z

Amorfni fáze:

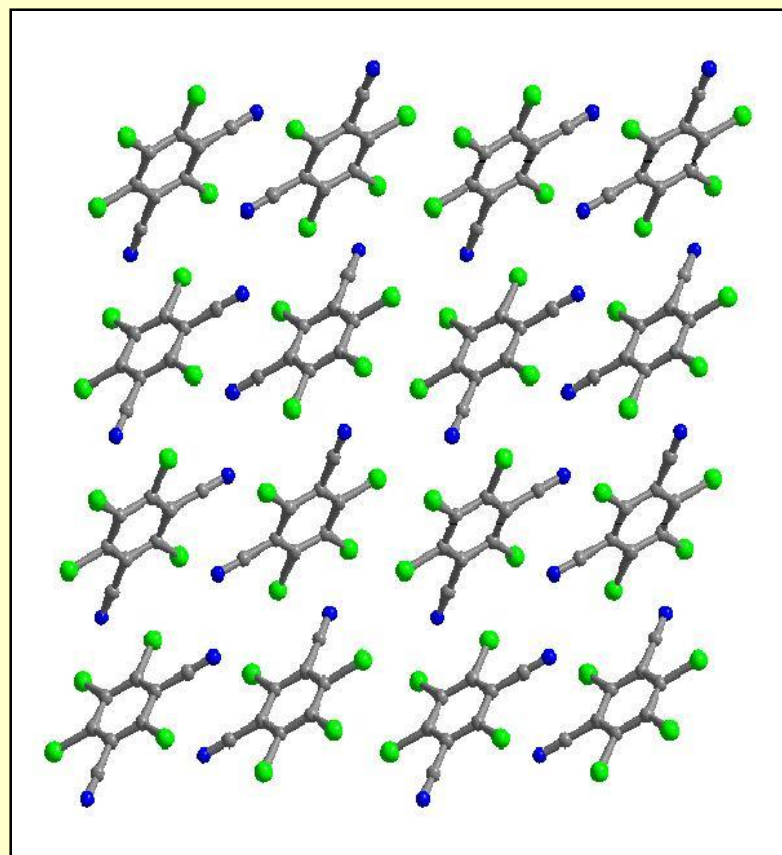
- teplota skelného přechodu, T_g
- vnitřní (neuspořádaná) struktura není charakterizována žádnými parametry

Ideální krystal - elementy krystalové geometrie

V nultém přiblížení hovoříme o tzv. ideální krystalové struktuře neboli o **ideálním krystalu**, který je dokonalý (neporušený) a nekonečně translačně periodický.

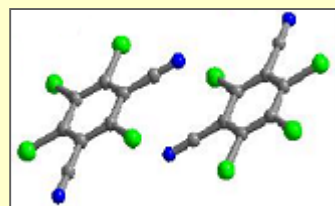
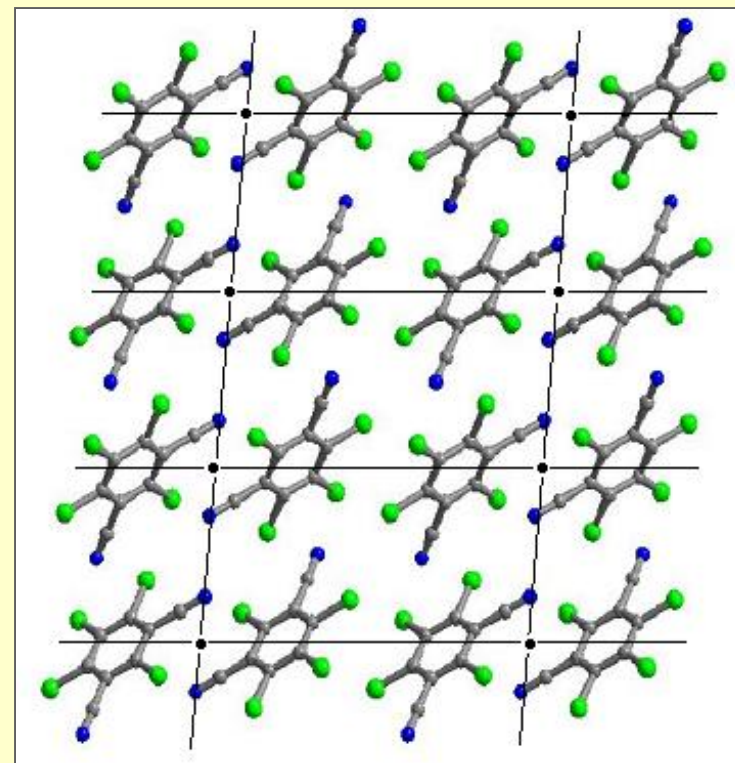
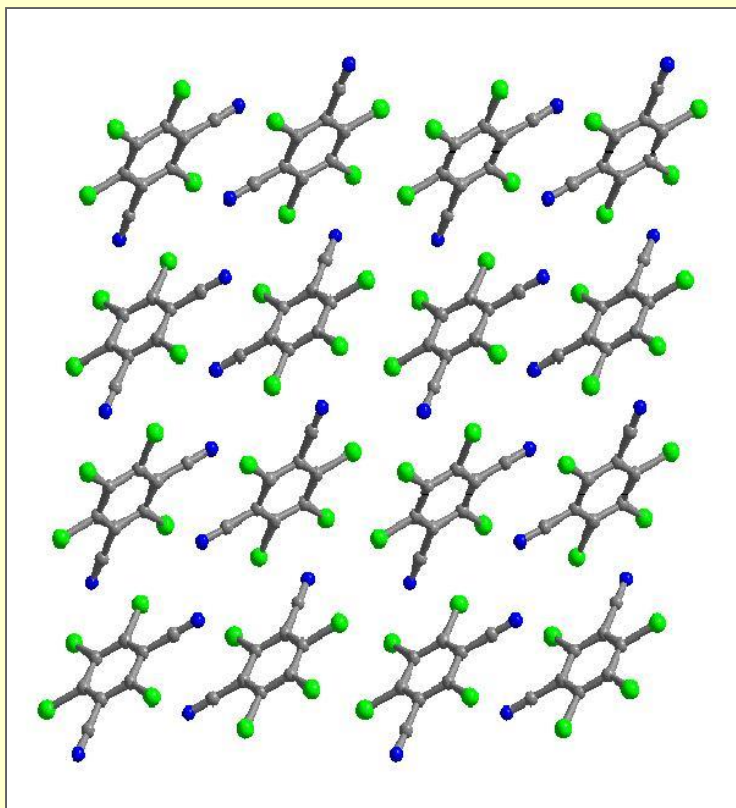


Krystalová struktura realita - el.mikroskopie



Ideální krystal - molekulární grafika, výstup z řešení RTG difrakčními metodami

Ideální krystal - popis

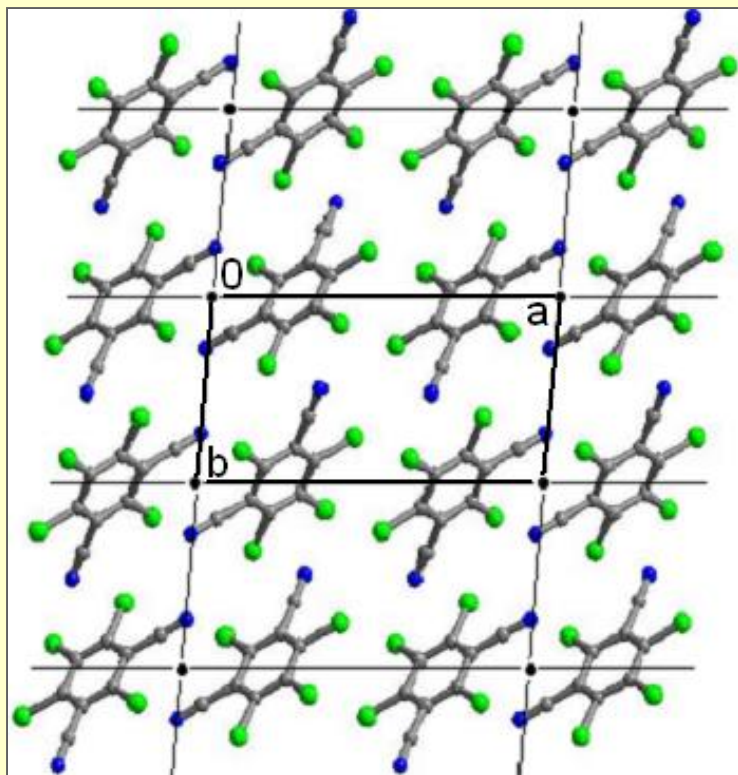


hmotná báze

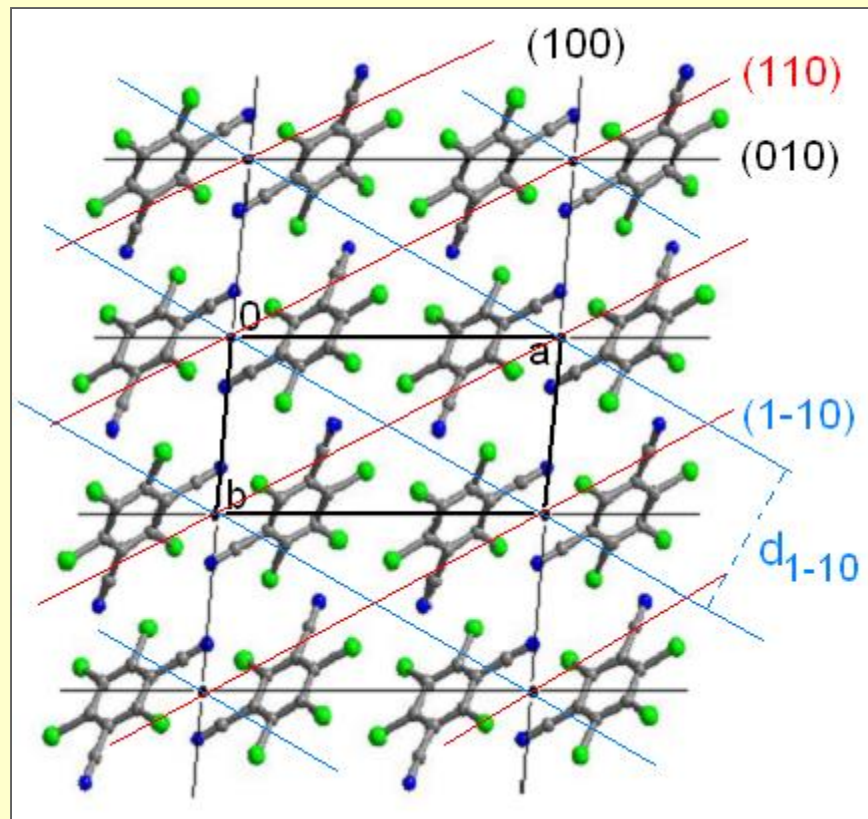
= •
uzel

Ideální krystalová struktura = prostorová mřížka + hmotná báze

Ideální krystal - popis

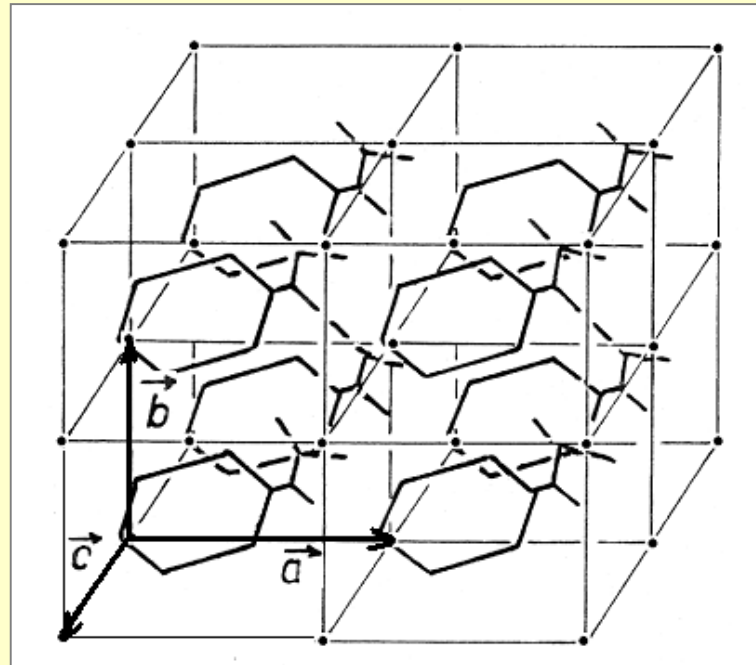


Elementární buňka ($a, b, c, \alpha, \beta, \gamma$)



Roviny (hkl) - „zrcadla“ - obsazeny atomy (elektrony), mezivrovinná vzdálenost d_{hkl}

Geometrie krystalové struktury - elementární buňka

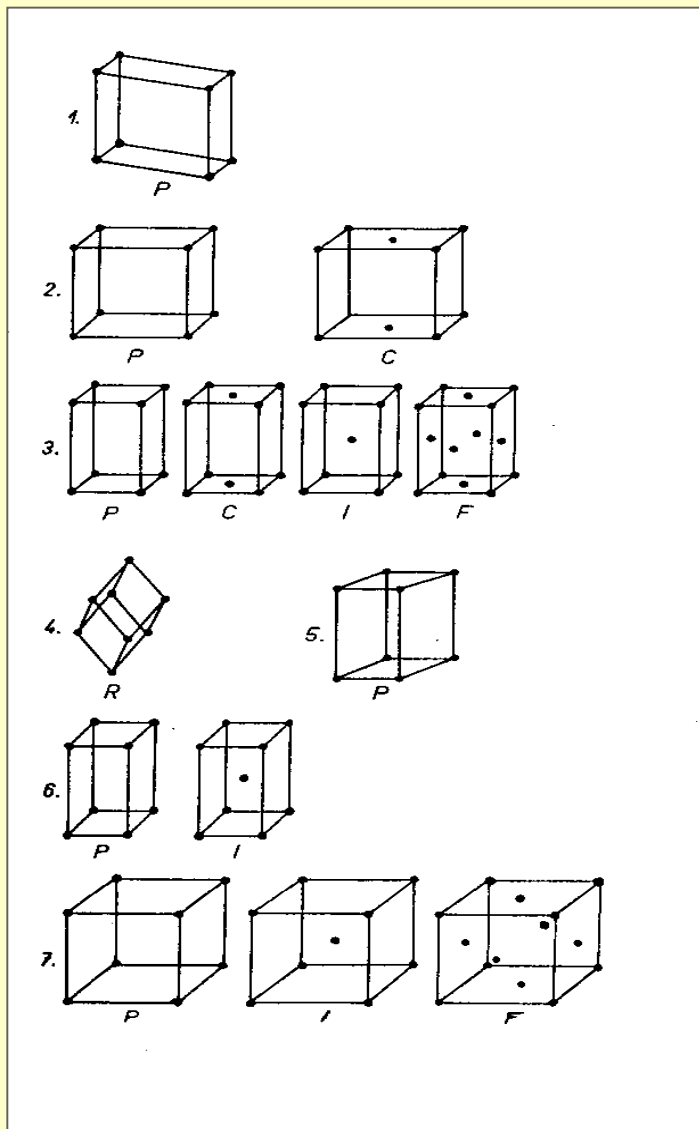


Rozměry buňky, délky hran a, b, c [Å] a jimi sevřené úhly α, β, γ [°], se také nazývají mřížkové parametry. Počet molekul v buňce udává symbol Z (zde $Z=1$). Objem $V = 2abc \cdot \sin s \cdot \sin(s - \alpha) \sin(s - \beta) \cdot \sin(s - \gamma)$, kde $s = (\alpha + \beta + \gamma)/2$. V [Å³].

14 Bravaisových buněk přiřazených k 7 krystalografickým soustavám

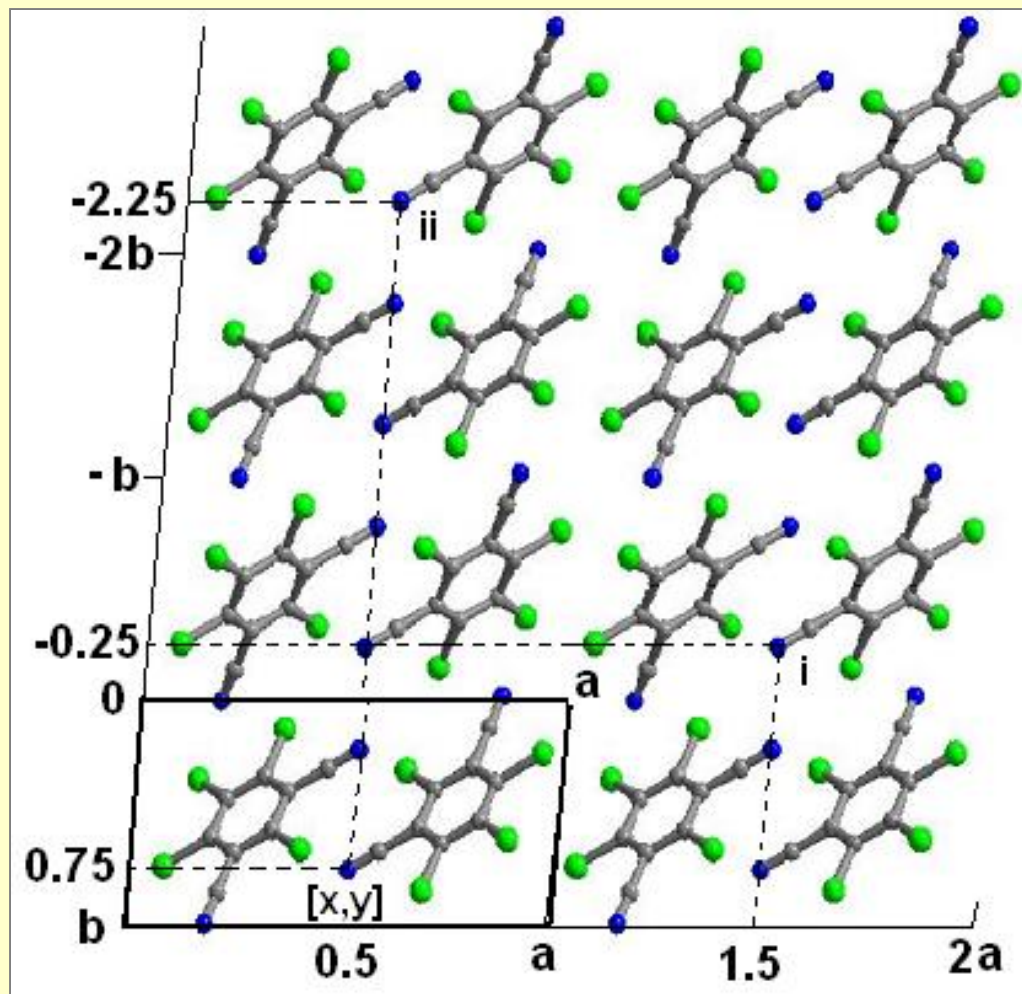
Krystalografické soustavy

1. Triklinická
2. Monoklinická
3. Orthorombická
4. Romboedrická
5. Hexagonální
6. Tetragonální
7. Kubická



Bravaisovy buňky

Pozice atomů v elementární buňce

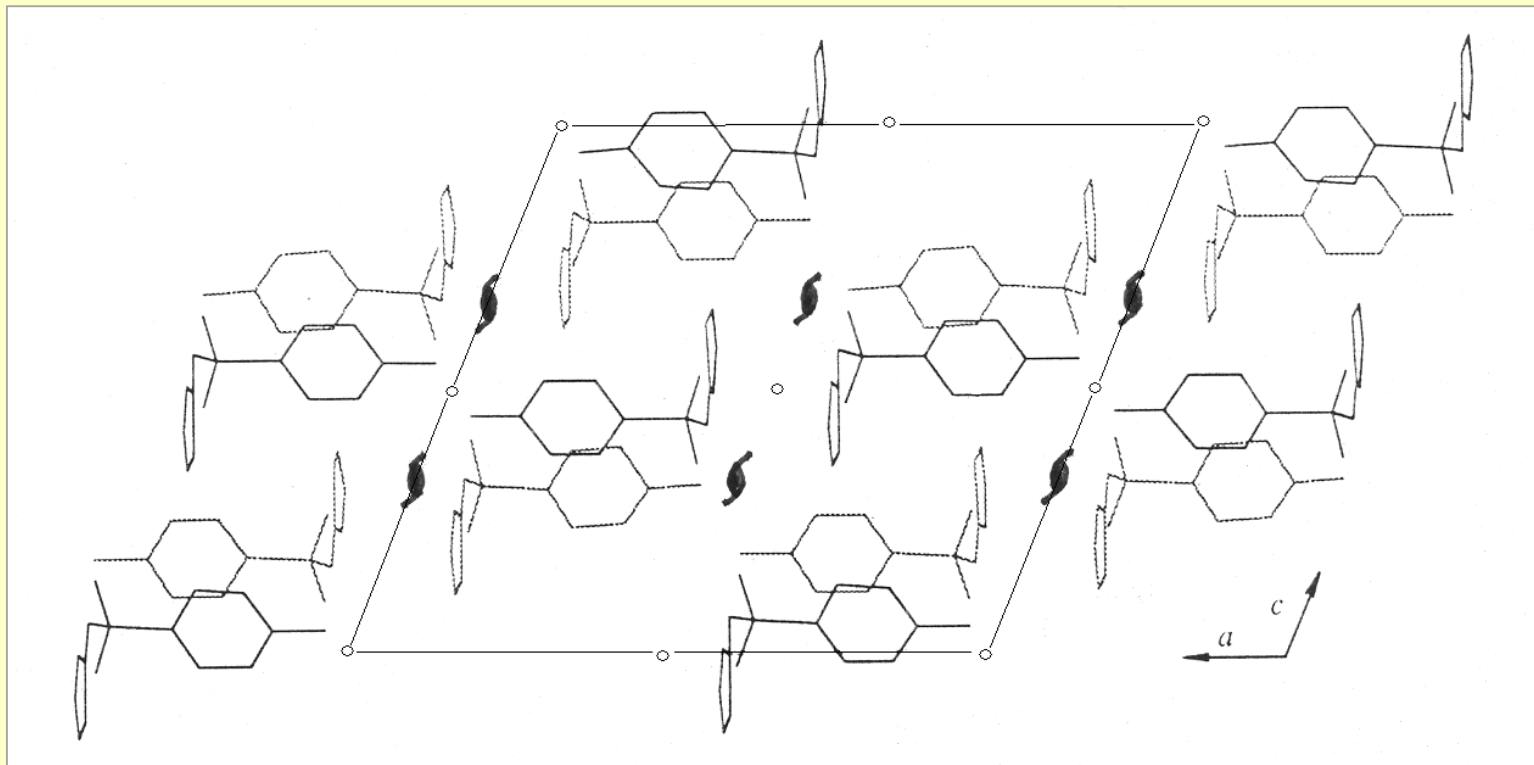


Pozici x,y,z udávají bezrozměrná čísla. Pozice atomu N v buňce: $x=0.5, y=0.75$; translačně symetrické pozice dalších atomů N :
 $i = x+1, y-1$; $ii = x, y-3$ atd.

Prostorová grupa - elementy krystalové symetrie

Prostorová grupa je soubor všech možných operací symetrie a jejich kombinací s elementární buňkou (primitivní nebo centrovanou), které je možné nalézt v dané krystalové struktuře. Vzhledem ke translační periodicitě krystalových struktur je počet možných prostorových grup omezen na 230.

Symbole P.G.: $P 1$, $P 2_1 / c$, $P 2_1 2_1 2_1$, $Pmna$



Krystalová struktura sulfathiazolu (forma III) s vyznačením elementární buňky, šroubových os 2_1 , skluzné roviny b , a středů souměrnosti $\bar{1}$ (prostorová grupa $P2_1/b$)

Kompletní popis symetrie krystalové struktury udává její prostorová grupa (space group).

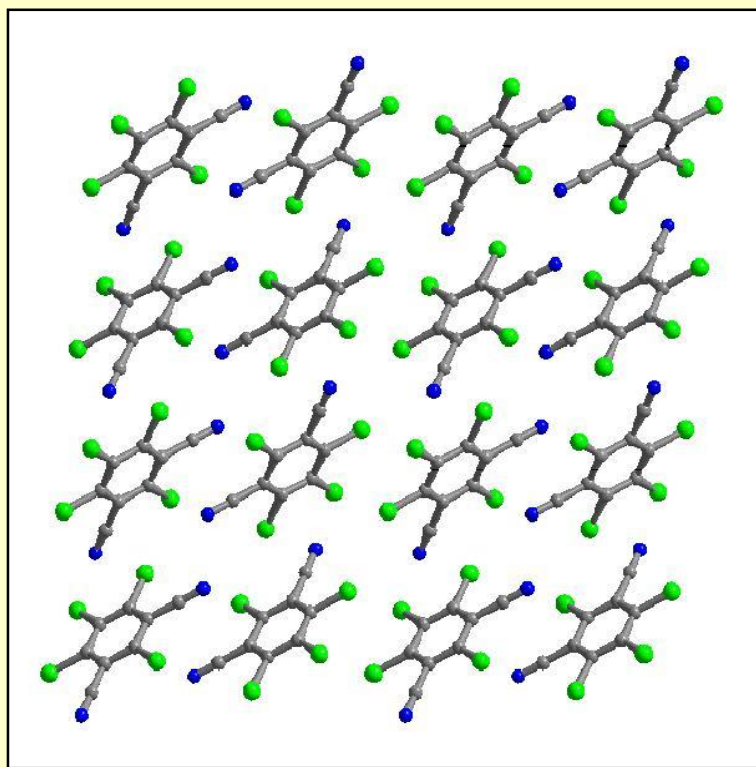
V přírodě existuje pouze 230 prostorově-symetrických uspořádání neboli 230 prostorových grup.

Zastoupení všech prostorových grup v přírodě není rovnoměrné, ale jsou upřednostňovány pouze některé →

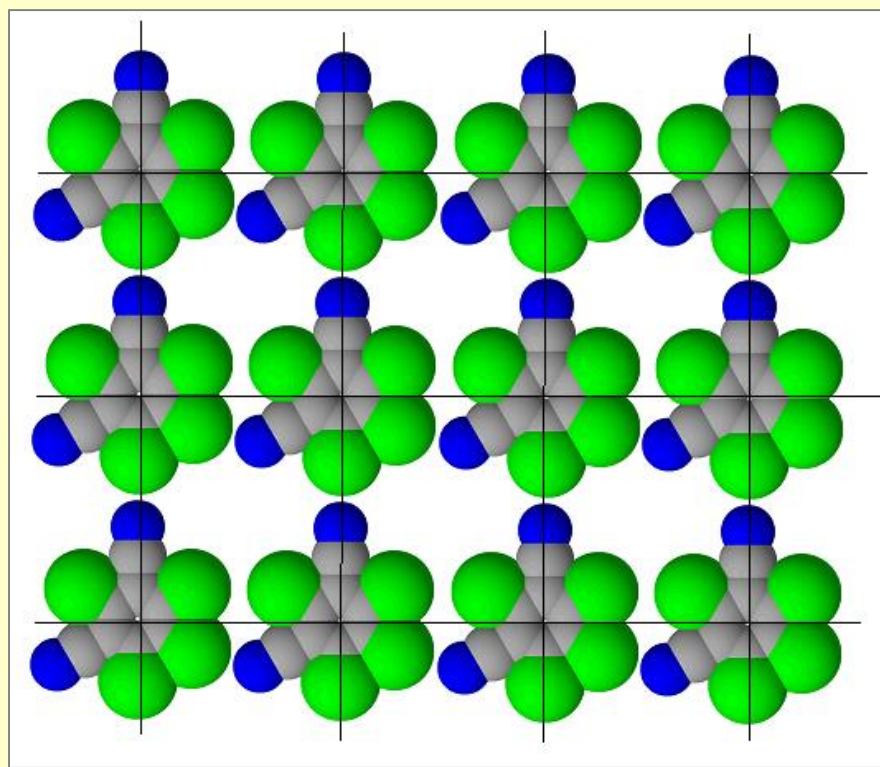
Soustava	bodová symetrie	prostorová grupa
Triclinic	1	P1
	$\bar{1}$	P $\bar{1}$
Monoclinic	2	P2, P2 ₁ , C2
	<i>m</i>	P <i>m</i> , P <i>c</i> , C <i>m</i> , C <i>c</i>
	2/ <i>m</i>	P2/ <i>m</i> , P2 ₁ / <i>m</i> , C2/ <i>m</i> , P2/ <i>c</i> , P2 ₁ / <i>c</i> , C2/ <i>c</i>
Orthorhombic	222	P222, P222 ₁ , P2 ₁ 2 ₁ 2, P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁ , C222 ₁ , C222, F222, I222, I2 ₁ 2 ₁ 2 ₁
	<i>mm</i> 2	P <i>mm</i> 2, P <i>mc</i> 2 ₁ , P <i>cc</i> 2, P <i>ma</i> 2 ₁ , P <i>ca</i> 2 ₁ , P <i>nc</i> 2 ₁ , P <i>mn</i> 2 ₁ , P <i>ba</i> 2, P <i>na</i> 2 ₁ , P <i>nn</i> 2, C <i>mm</i> 2, C <i>mc</i> 2 ₁ , C <i>cc</i> 2, A <i>mm</i> 2, A <i>bm</i> 2, A <i>ma</i> 2, A <i>ba</i> 2, F <i>mm</i> 2, F <i>dd</i> 2, I <i>mm</i> 2, I <i>ba</i> 2, I <i>ma</i> 2
	<i>mmm</i>	P <i>mmm</i> , P <i>nnn</i> , P <i>ccm</i> , P <i>ban</i> , P <i>mna</i> , P <i>naa</i> , P <i>mma</i> , P <i>cca</i> , P <i>bam</i> , P <i>ccn</i> , P <i>bcm</i> , P <i>nnm</i> , P <i>mmm</i> , P <i>bcn</i> , P <i>bca</i> , P <i>mna</i> , C <i>mcm</i> , C <i>mca</i> , C <i>mmm</i> , C <i>ccm</i> , C <i>mna</i> , C <i>cca</i> , F <i>mmm</i> , F <i>ddd</i> , I <i>mmm</i> , I <i>bam</i> , I <i>bca</i> , I <i>mna</i>
Tetragonal	4	P4, P4 ₁ , P4 ₂ , P4 ₃ , I4, I4 ₁
	$\bar{4}$	P $\bar{4}$, I $\bar{4}$
	4/ <i>m</i>	P4/ <i>m</i> , P4 ₂ / <i>m</i> , P4/ <i>n</i> , P4 ₂ / <i>n</i> , I4/ <i>m</i> , I4 ₁ / <i>a</i>
	422	P422, P4 ₂ 12, P4 ₁ 22, P4 ₁ 2 ₁ 2, P4 ₂ 22, P4 ₂ 2 ₁ 2, P4 ₃ 22, P4 ₃ 2 ₁ 2, I422, I4 ₁ 22
	4 <i>mm</i>	P4 <i>mm</i> , P4 <i>bm</i> , P4 ₂ <i>cm</i> , P4 ₂ <i>nm</i> , P4 <i>cc</i> , P4 <i>nc</i> , P4 ₂ <i>mc</i> , P4 ₂ <i>bc</i> , I4 <i>mm</i> , I4 <i>cm</i> , I4 ₁ <i>md</i> , I4 ₁ <i>cd</i>
	4 <i>m</i>	P4 ₂ <i>m</i> , P4 ₂ <i>c</i> , P4 ₂ 1 <i>m</i> , P4 ₂ 1 <i>c</i> , P4 ₂ <i>m</i> 2, P4 ₂ <i>c</i> 2, P4 ₂ <i>b</i> 2, P4 ₂ <i>n</i> 2, I4 ₂ <i>m</i> 2, I4 ₂ <i>c</i> 2, I4 ₂ <i>m</i> , I4 ₂ <i>d</i>
4/ <i>mmm</i>	P4/ <i>mmm</i> , P4/ <i>mcc</i> , P4/ <i>nbm</i> , P4/ <i>nnc</i> , P4/ <i>mbm</i> , P4/ <i>mnc</i> , P4/ <i>num</i> , P4/ <i>ncc</i> , P4 ₂ / <i>mnc</i> , P4 ₂ / <i>mcm</i> , P4 ₂ / <i>nbc</i> , P4 ₂ / <i>nnm</i> , P4 ₂ / <i>mbc</i> , P4 ₂ / <i>nmn</i> , P4 ₂ / <i>nmc</i> , P4 ₂ / <i>ncm</i> , I4/ <i>mmm</i> , I4/ <i>mcm</i> , I4 ₁ / <i>amd</i> , I4 ₁ / <i>acd</i>	
Trigonal	3	P3, P3 ₁ , P3 ₂ , R3
	$\bar{3}$	P $\bar{3}$, R $\bar{3}$
	32	P312, P321, P3 ₁ 12, P3 ₁ 21, P3 ₂ 12, P3 ₂ 21, R32
	3 <i>m</i>	P3 <i>m</i> 1, P31 <i>m</i> , P3 <i>c</i> 1, P31 <i>c</i> , R3 <i>m</i> , R3 <i>c</i>
	$\bar{3}m$	P $\bar{3}$ 1 <i>m</i> , P $\bar{3}$ 1 <i>c</i> , P $\bar{3}$ 1 <i>m</i> 1, P $\bar{3}$ 1 <i>c</i> 1, R $\bar{3}$ <i>m</i> , R $\bar{3}$ <i>c</i>
Hexagonal	6	P6, P6 ₁ , P6 ₅ , P6 ₃ , P6 ₂ , P6 ₄
	$\bar{6}$	P $\bar{6}$
	6/ <i>m</i>	P6/ <i>m</i> , P6 ₃ / <i>m</i>
	622	P622, P6 ₁ 22, P6 ₅ 22, P6 ₂ 22, P6 ₄ 22, P6 ₃ 22
	6 <i>mm</i>	P6 <i>mm</i> , P6 <i>cc</i> , P6 ₃ <i>cm</i> , P6 ₃ <i>mc</i>
	6 <i>m</i>	P6 <i>m</i> 2, P6 <i>c</i> 2, P6 <i>2m</i> , P6 <i>2c</i>
6/ <i>mmm</i>	P6/ <i>mmm</i> , P6/ <i>mcc</i> , P6 ₃ / <i>mcm</i> , P6 ₃ / <i>mmc</i>	
Cubic	23	P23, F23, I23, P2 ₁ 3, I2 ₁ 3
	<i>m</i> $\bar{3}$	P <i>m</i> $\bar{3}$, P <i>n</i> $\bar{3}$, F <i>m</i> $\bar{3}$, F <i>d</i> $\bar{3}$, I <i>m</i> $\bar{3}$, P <i>a</i> $\bar{3}$, I <i>a</i> $\bar{3}$
	432	P432, P4 ₂ 32, F432, F4 ₃ 2, I432, P4 ₃ 32, P4 ₁ 32, I4 ₁ 32
	$\bar{4}3m$	P $\bar{4}$ 3 <i>m</i> , F43 <i>m</i> , I43 <i>m</i> , P43 <i>n</i> , F43 <i>c</i> , I43 <i>d</i>
	<i>m</i> $\bar{3}m$	P <i>m</i> $\bar{3}$ <i>m</i> , P <i>n</i> $\bar{3}$ <i>n</i> , P <i>m</i> $\bar{3}$ <i>n</i> , P <i>n</i> $\bar{3}$ <i>m</i> , F <i>m</i> $\bar{3}$ <i>m</i> , F <i>m</i> $\bar{3}$ <i>c</i> , F <i>d</i> $\bar{3}$ <i>m</i> , F <i>d</i> $\bar{3}$ <i>c</i> , I <i>m</i> $\bar{3}$ <i>m</i> , I <i>a</i> $\bar{3}$ <i>d</i>

Analyticky využitelná data ve strukturní RTG difrakci:

1) intenzita difrakční stopy, I_{hkl}



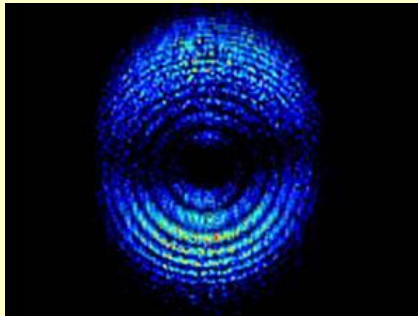
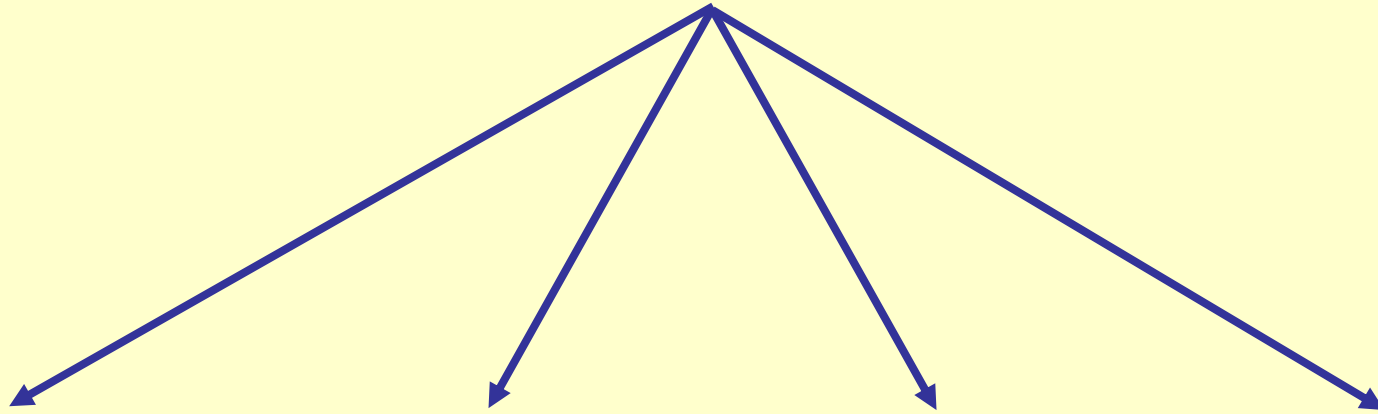
Strukturní model typu „ball and sticks“



Realističtější pohled na strukturu (distribuce elektronové hustoty)

Abstraktní rozklad RTG difrakčního experimentu - jak vznikají difrakční intenzity

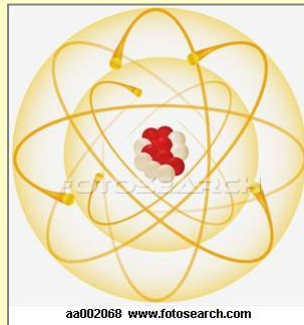
Intenzita difrakce I_{hkl} souvisí přímo úměrně s „množstvím elektronů“ v rovině hkl



elektron



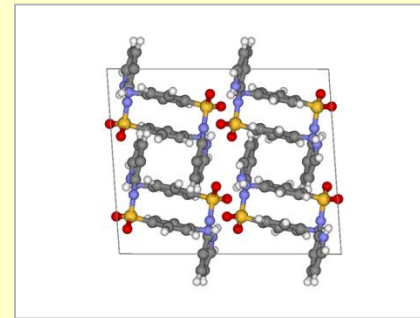
<http://blogearth.wordpress.com/2008/02/27/electron-filmed-for-the-first-time/>



atom

f_j

atomový faktor



el. buňka

F_{hkl}

strukturní faktor

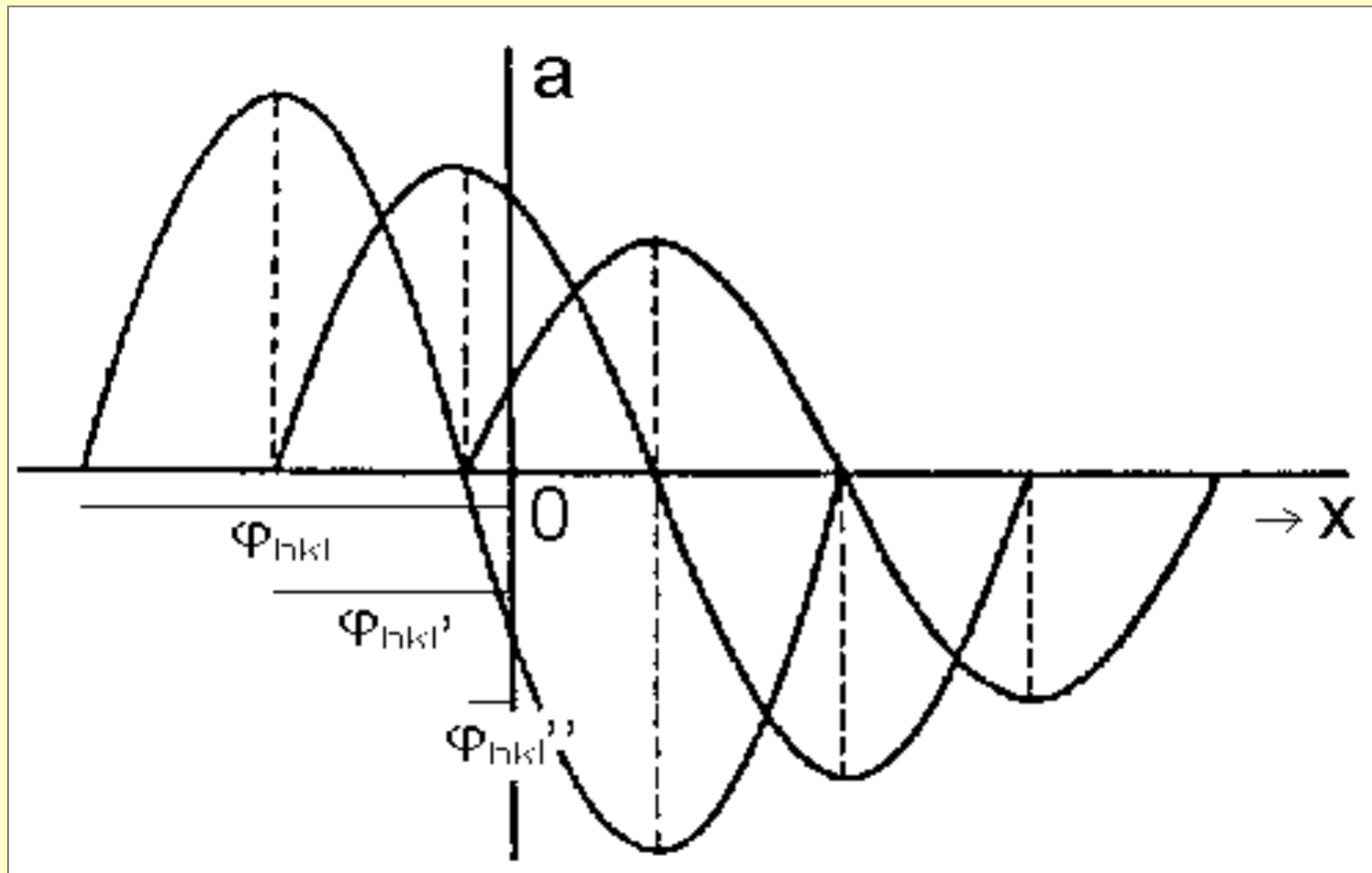


krystal

I_{hkl}

pozorovaná intenzita

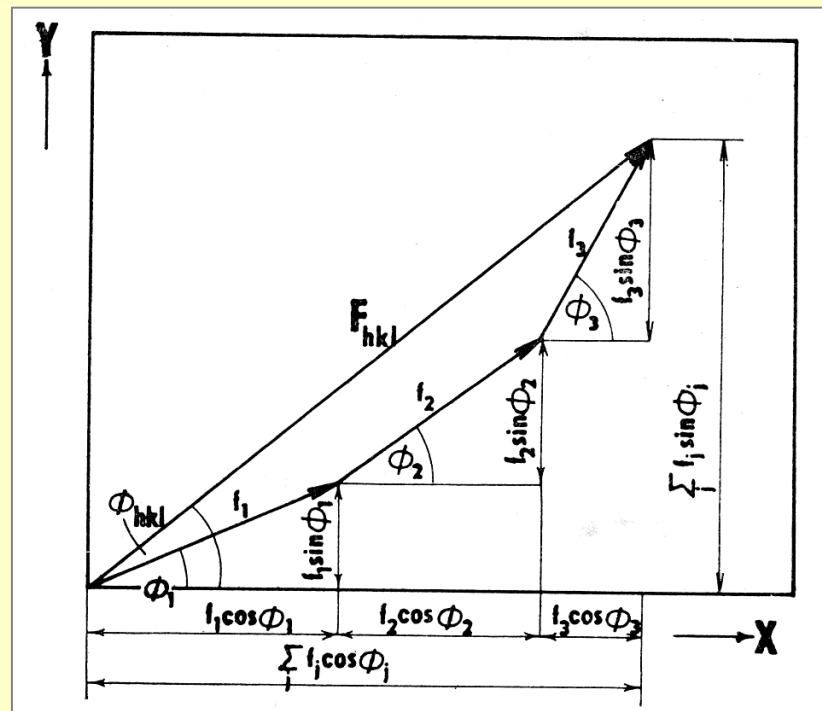
Difrakce od různých rovin (hkl) jsou vůči sobě a počátku různě fázově posunuty, tzn., že ke každé intenzitě I_{hkl} přísluší hodnota fáze φ_{hkl}



Experimentálně (RTG difrakcí) jsou měřitelné pouze hodnoty I_{hkl}

Strukturní faktor F_{hkl} - „difrakční mohutnost jedné elementární buňky“

Skládáme příspěvky všech j - atomů v elementární buňce - sčítání vln (atomových amplitud f_j a jejich fází ϕ_j)



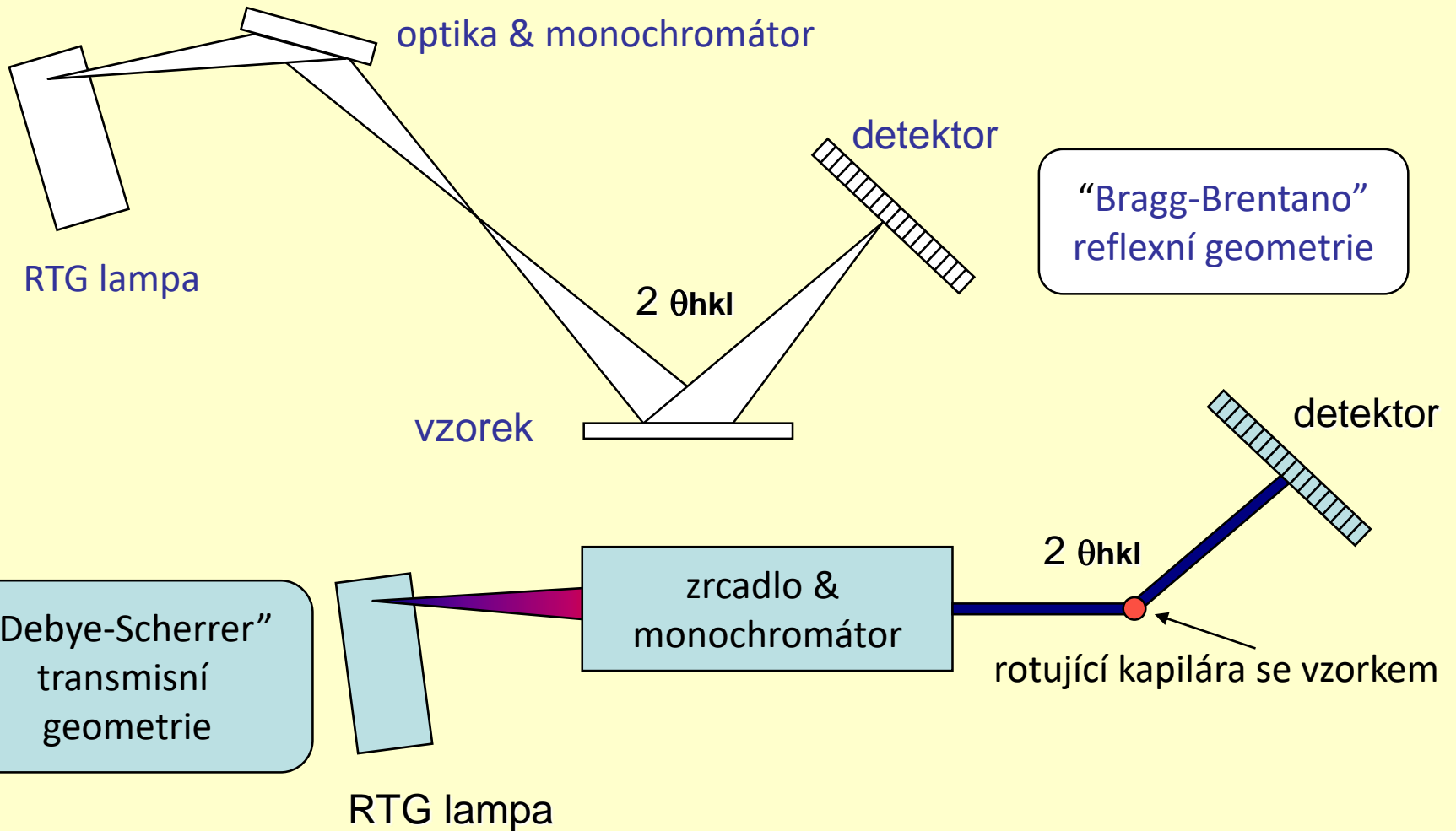
$$F_{hkl} = \sum_j f_j \cos 2\pi(hx_j + ky_j + lz_j) + i \sum_j f_j \sin 2\pi(hx_j + ky_j + lz_j)$$

$\phi_j = 2\pi (hx_j + ky_j + lz_j)$ - hodnota fáze je závislá na pozici atomu $x_j y_j z_j$

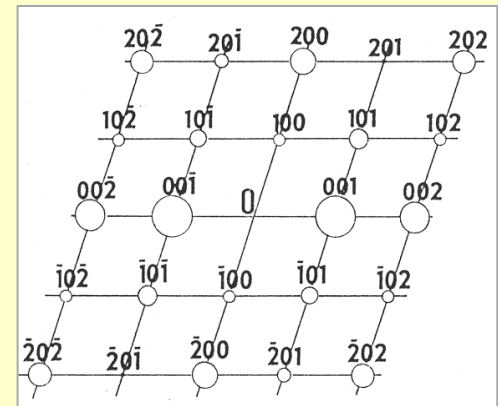
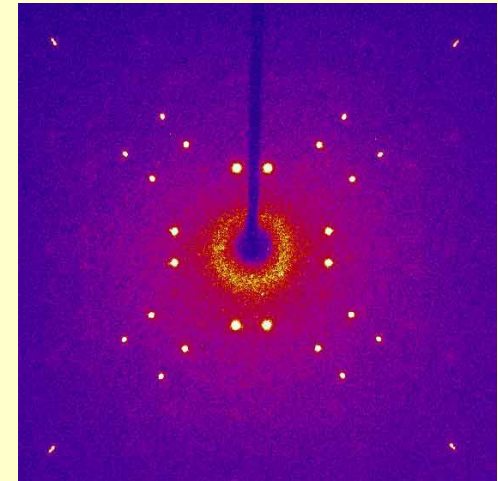
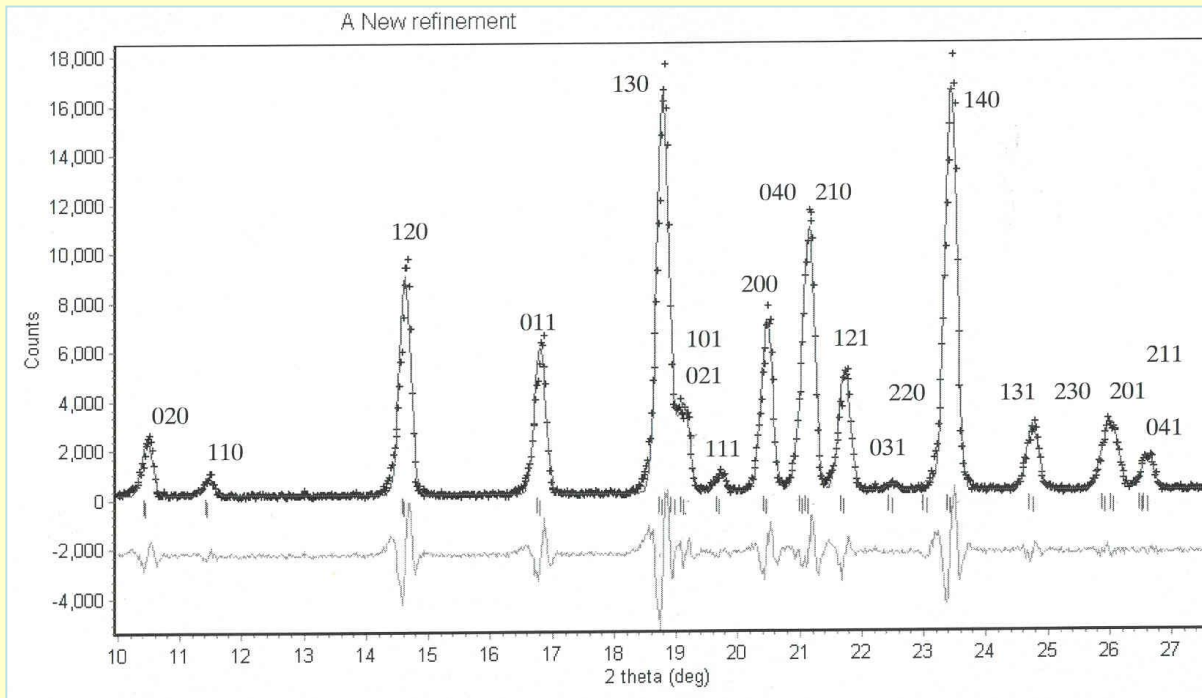
$$I_{hkl} \sim |F_{hkl}|^2$$

Analyticky využitelná data ve fázové RTG difrakci:

2) poloha difrakční skvrny, $2\theta_{hkl}$



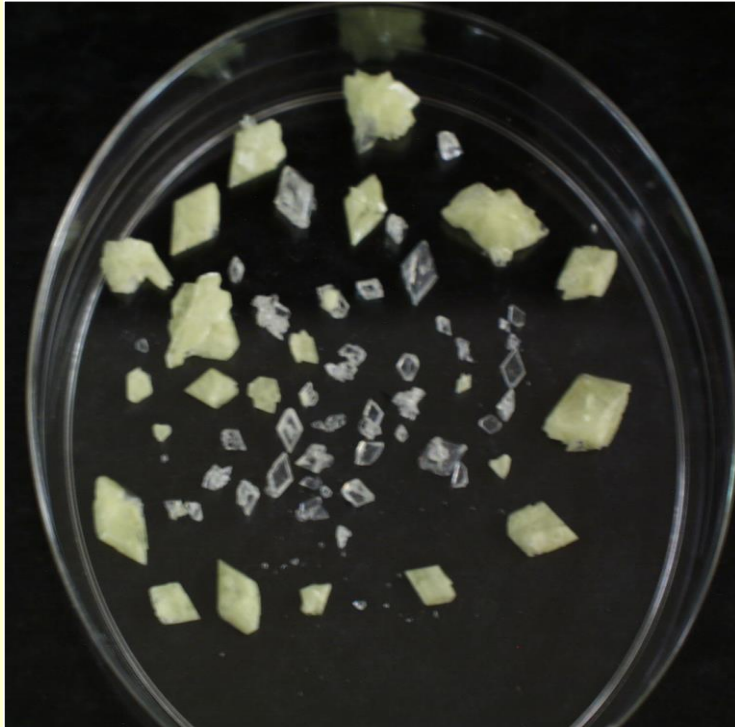
Souhrnná data I_{hkl} , $2\theta_{hkl}$ ($10 - 10^6$ dat)



$$\lambda = 2d_{hkl} \sin \theta_{hkl}$$

Z poloh difrakcí ($2\theta_{hkl}$) lze vypočítat mřížkové parametry ($a, b, c, \alpha, \beta, \gamma$);
 Z intenzit difrakcí (I_{hkl}) lze určit pozice atomů v elementární buňce (x, y, z)
 Z vyhasínání difrakcí ($I_{hkl} = 0$) lze určit prostorovou grupu krystalu

RTG strukturní analýza na monokrystalu - rutinní technika



Vstupní materiál - monokrystal

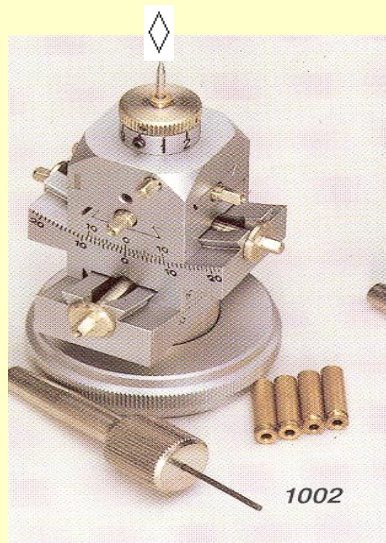
Příprava

- vhodné rozpouštědlo resp. kombinace rozpouš.
- nejpomalejší dosažení mírně přesyceného roztoku (pomalé chladnutí i desítky hod.)
 - pomalá difúze „srážedla“ do roztoku
 - nerušený růst
 - trpělivost (desítky pokusů...)

Výběr

- rozměr $\sim 10^{-1}$ mm (výjimečně i menší)
- bez zjevných defektů (srostlice atd.)
 - průhledný
- nestabilní materiál (kapilára nebo pokrytí inertní vrstvou)
 - elementární analýza !!!

Experiment - RTG difrakce na monokrystalu



goniometrická
hlavička



Goniometr
záření ($\text{MoK}\alpha$, $\text{CuK}\alpha$)

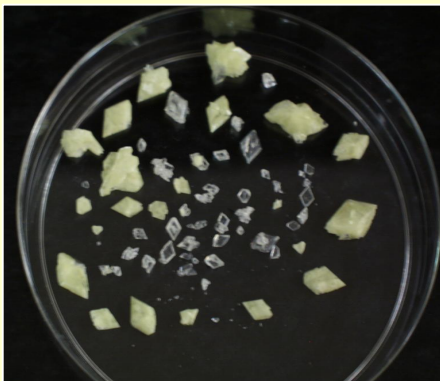


monokrystalový
difraktometr

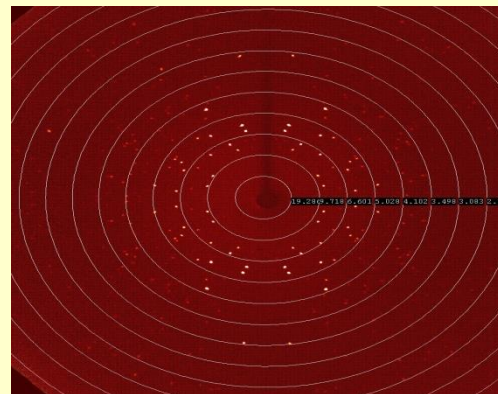
Měření:

- během řádově několika hodin se proměří téměř celý difrakční prostor ($-h \rightarrow +h$; $-k \rightarrow +k$; $-l \rightarrow +l$) a získá se několik tisíc až stovek tisíc difrakcí (reflexí) - „measured reflections“ „independent reflections“
- pro potlačení teplotních vibrací atomů se měří za nízké teploty (150 K)

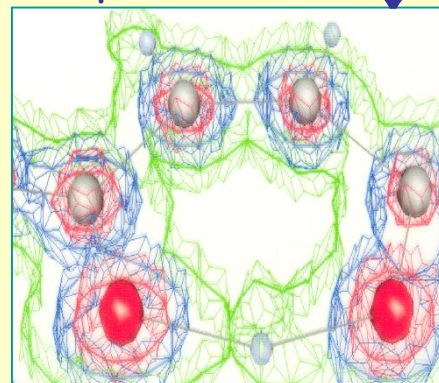
Postup řešení krystalové struktury



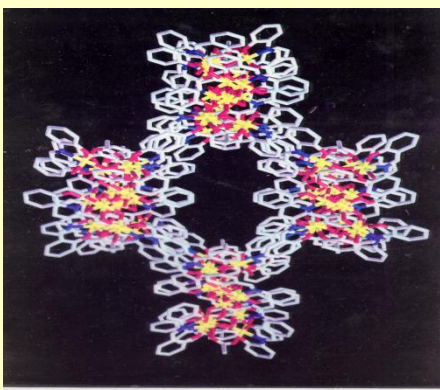
vstupní monokrystal



RTG difrakční
experiment



výpočet mapy elektronové
hustoty



zobrazení výsledku
molekulární grafikou

Zpracování dat - RTG strukturní analýza

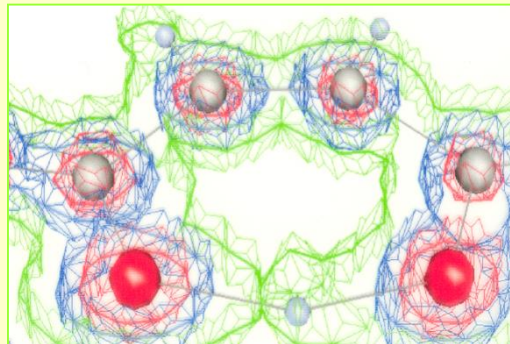
Vstupní soubor: d_{hkl} (θ_{hkl}), I_{hkl}

$$\rho(xyz) = (1/V) \sum_h \sum_k \sum_l F_{hkl} \exp [-2\pi i (hx + ky + lz)]$$

$$F_{hkl} = |F_{hkl}| \exp i\varphi_{hkl} \quad |F_{hkl}|^2 \approx I_{hkl} \quad - \quad \text{fázový problém}$$

Přímé metody - určení hodnot fází, φ_{hkl} , ze statistických a pravděpodobnostních výpočtů z I_{hkl} (Karle & Hauptmann, Nobelova cena za chemii v r. 1985)

„**Charge flipping**“ – nová metoda z r.2004 využívající brutální síly počítačů

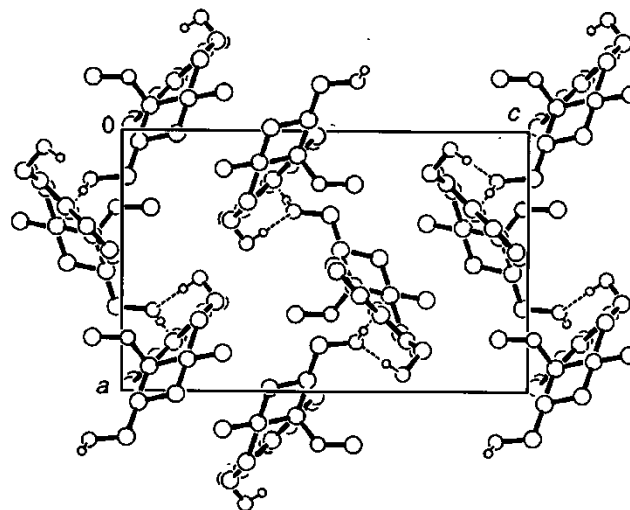
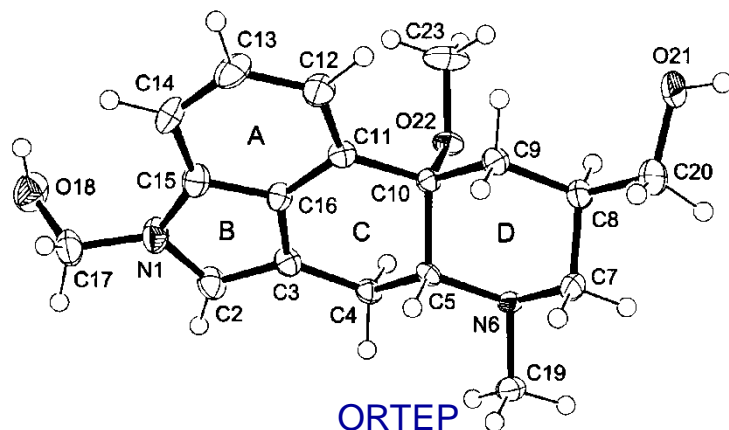


Mapa elektronové hustoty

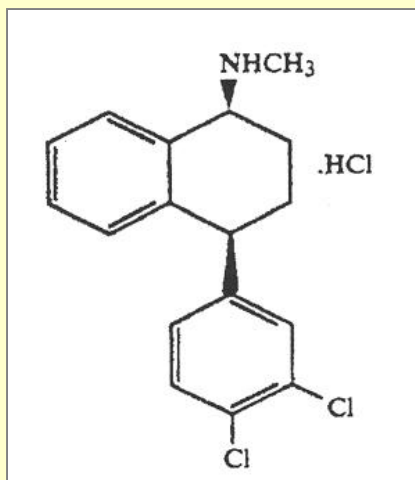
RTG strukturní analýza - výsledky

Table 3. Atomic coordinates and displacement parameters (in Å²).

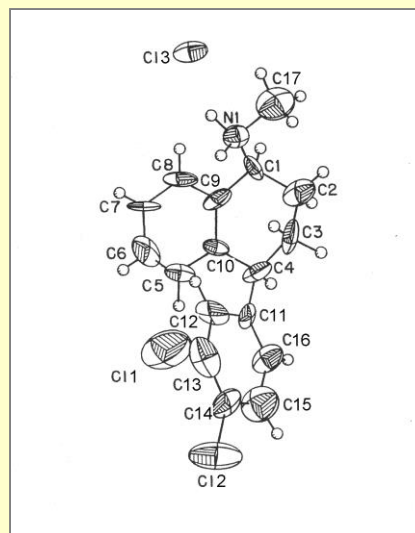
Atom	Site	x	y	z	U ₁₁	U ₂₂	U ₃₃	U ₁₂	U ₁₃	U ₂₃
O(18)	4a	0.5676(2)	0.5512(2)	0.1929(1)	0.0359(9)	0.0371(9)	0.050(1)	0.0118(7)	0.0065(8)	0.0036(8)
O(21)	4a	1.1907(2)	-0.2026(2)	-0.0774(1)	0.054(1)	0.0298(8)	0.0366(9)	0.0194(8)	0.0192(8)	0.0009(7)
O(22)	4a	0.7969(1)	-0.0105(1)	0.01529(8)	0.0224(7)	0.0283(7)	0.0142(6)	-0.0012(5)	-0.0047(5)	0.0001(5)
N(1)	4a	0.6982(2)	0.3690(2)	0.2018(1)	0.0283(9)	0.0216(9)	0.037(1)	0.0051(7)	0.0075(8)	-0.0027(8)
N(6)	4a	0.8781(2)	-0.1528(2)	0.1627(1)	0.0248(8)	0.0162(7)	0.0131(7)	-0.0002(6)	-0.0032(6)	0.0008(6)
C(2)	4a	0.6568(2)	0.2538(2)	0.2309(1)	0.0246(9)	0.027(1)	0.030(1)	0.0015(8)	0.0086(8)	-0.0032(9)
C(3)	4a	0.7245(2)	0.1635(2)	0.1870(1)	0.0177(8)	0.0238(9)	0.0230(9)	-0.0005(7)	0.0036(7)	-0.0022(8)
C(4)	4a	0.7284(2)	0.0265(2)	0.1908(1)	0.0212(8)	0.0209(9)	0.0181(8)	-0.0012(7)	0.0065(7)	0.0006(7)
C(5)	4a	0.8703(2)	-0.0174(2)	0.1605(1)	0.0167(8)	0.0180(8)	0.0131(8)	-0.0030(6)	-0.0015(6)	-0.0041(7)
C(7)	4a	1.0120(2)	-0.1975(2)	0.1344(1)	0.028(1)	0.0196(9)	0.0231(9)	0.0071(7)	-0.0047(7)	0.0002(7)
C(8)	4a	1.0432(2)	-0.1574(2)	0.0424(1)	0.026(1)	0.0227(9)	0.0214(9)	0.0061(8)	0.0001(7)	-0.0019(8)
C(9)	4a	1.0424(2)	-0.0177(2)	0.0382(1)	0.0173(8)	0.0235(9)	0.0216(9)	0.0036(7)	0.0046(7)	0.0008(7)
C(10)	4a	0.9056(2)	0.0340(2)	0.0686(1)	0.0154(8)	0.0177(8)	0.0162(8)	0.0010(7)	0.0012(7)	0.0008(7)
C(11)	4a	0.9047(2)	0.1741(2)	0.0713(1)	0.0166(8)	0.0217(9)	0.0204(9)	-0.0008(7)	0.0009(7)	0.0011(7)
C(12)	4a	0.9809(2)	0.2546(2)	0.0219(2)	0.026(1)	0.027(1)	0.033(1)	0.0004(8)	0.0121(9)	0.0047(9)
C(13)	4a	0.9616(2)	0.3819(2)	0.0299(2)	0.031(1)	0.026(1)	0.042(1)	-0.0063(9)	0.007(1)	0.0126(9)
C(14)	4a	0.8697(2)	0.4339(2)	0.0866(2)	0.031(1)	0.0164(8)	0.041(1)	-0.0002(8)	-0.0018(9)	0.0055(9)
C(15)	4a	0.7946(2)	0.3528(2)	0.1381(1)	0.0203(9)	0.022(1)	0.032(1)	0.0015(8)	-0.0016(8)	-0.0015(8)
C(16)	4a	0.8119(2)	0.2262(2)	0.1284(1)	0.0160(8)	0.0188(9)	0.0236(9)	0.0009(7)	0.0007(7)	-0.0001(7)
C(17)	4a	0.6597(3)	0.4844(2)	0.2413(2)	0.039(1)	0.026(1)	0.034(1)	0.0069(9)	0.0002(9)	-0.0079(9)
C(19)	4a	0.8532(2)	-0.2010(2)	0.2499(1)	0.042(1)	0.0218(9)	0.0186(9)	-0.0011(8)	-0.0019(8)	0.0029(8)
C(20)	4a	1.1776(3)	-0.2136(2)	0.0132(2)	0.038(1)	0.037(1)	0.033(1)	0.020(1)	0.0056(9)	-0.000(1)
C(23)	4a	0.7954(3)	0.0312(3)	-0.0716(1)	0.035(1)	0.063(2)	0.019(1)	-0.002(1)	-0.0046(9)	0.010(1)



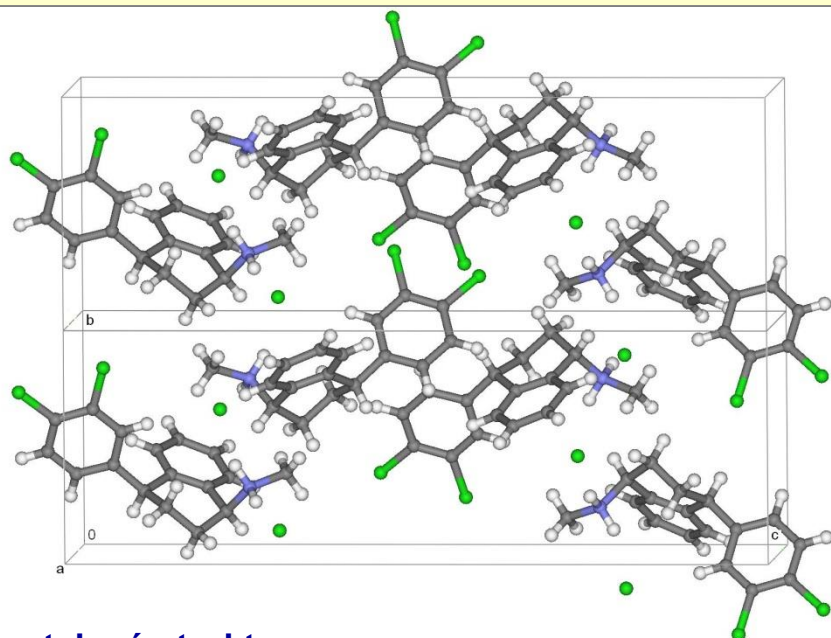
Příklad vyřešené krystalové struktury - sertralin . HCl (antidepressivum)



Chemická struktura



Molekulová struktura



Krystalová struktura

Základní krystalografické parametry

Cell dimensions (Å) $a = 8.004(5)$
 $b = 8.372(5)$
 $c = 25.21(2)$

Cell volume (Å³) $V = 1689.3(6)$
Space group $P2_12_12_1$

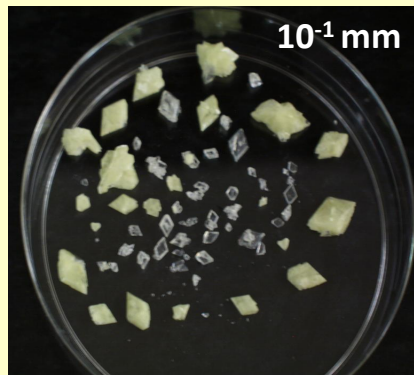
Crystal system Orthorhombic

Molecules/unit cell, $Z = 4$

Density calculated (g/cm³) $\rho = 1.354$

Primárním produktem výroby léčivé látky je prášek

RTG strukturní analýza nikoliv z monokrystalu, ale z prášku !

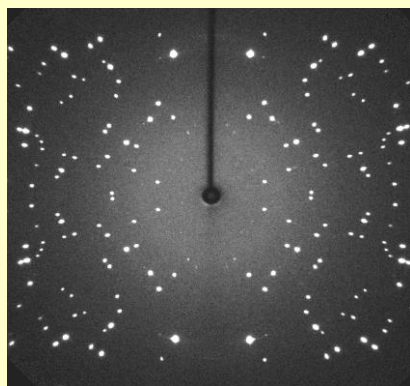


monokrystal

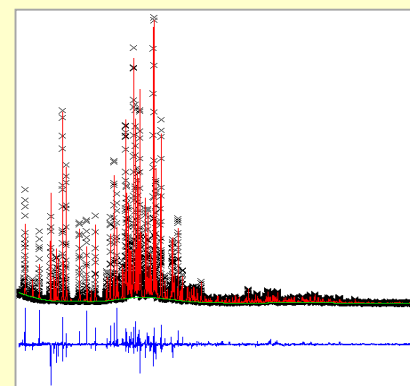
Krystalizace v laboratoři



prášek



RTG difrakční experiment



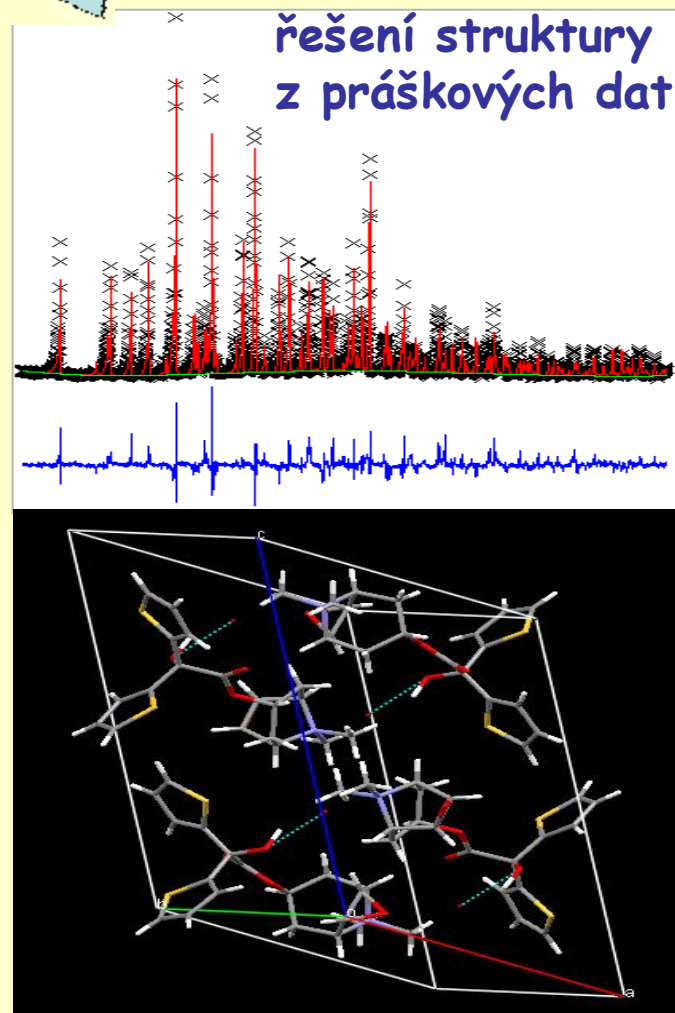
RTG difrakční experiment

Řešení krystalové struktury z prášku

manipulace a získávání
dat z mikromonokrystalů
 $\sim 10^{-2}$ mm

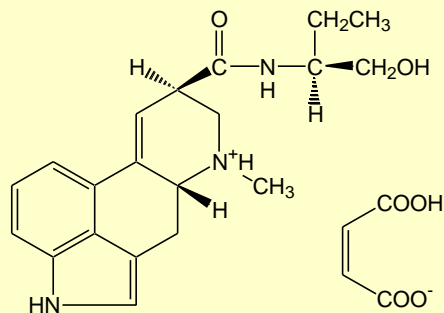


7-kruhový RTG difraktometr u
synchrotronového zdroje ESRF
v Grenoble

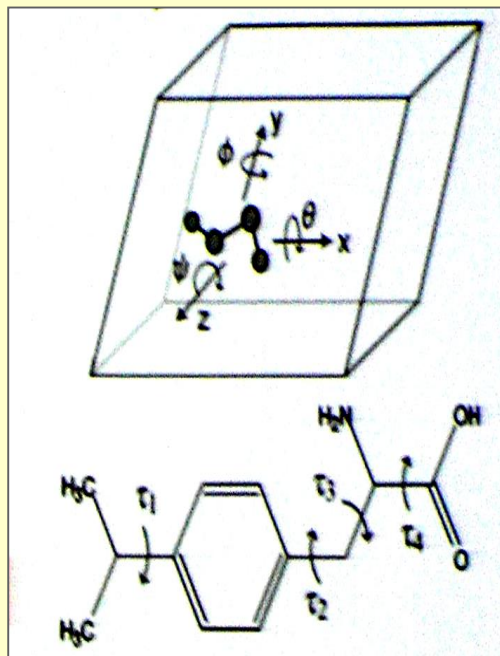


molekula má 14 DOF

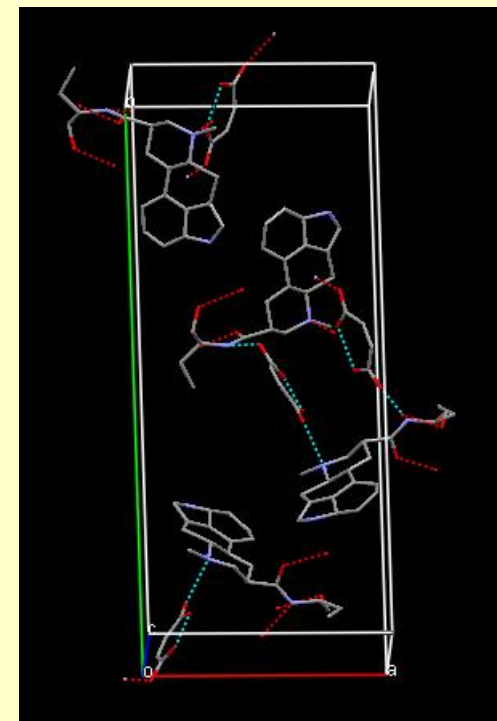
Studium krystalové a molekulové struktury - z práškových RTG difrakčních dat (nestandardní technika)



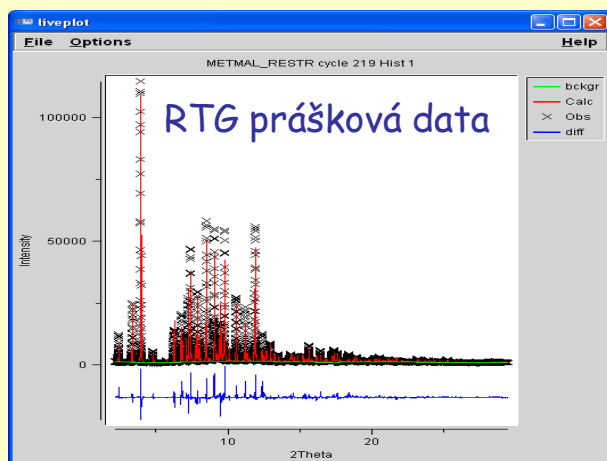
methylergometrin maleinát



parametry DOF



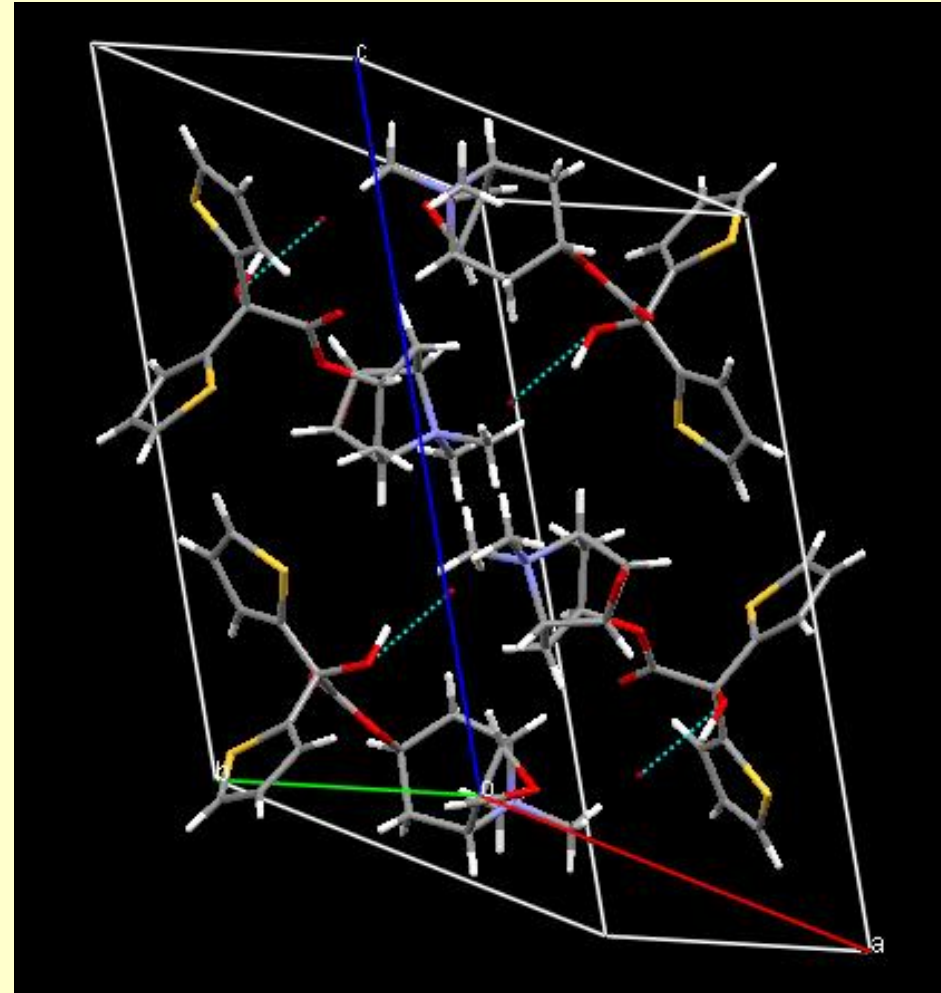
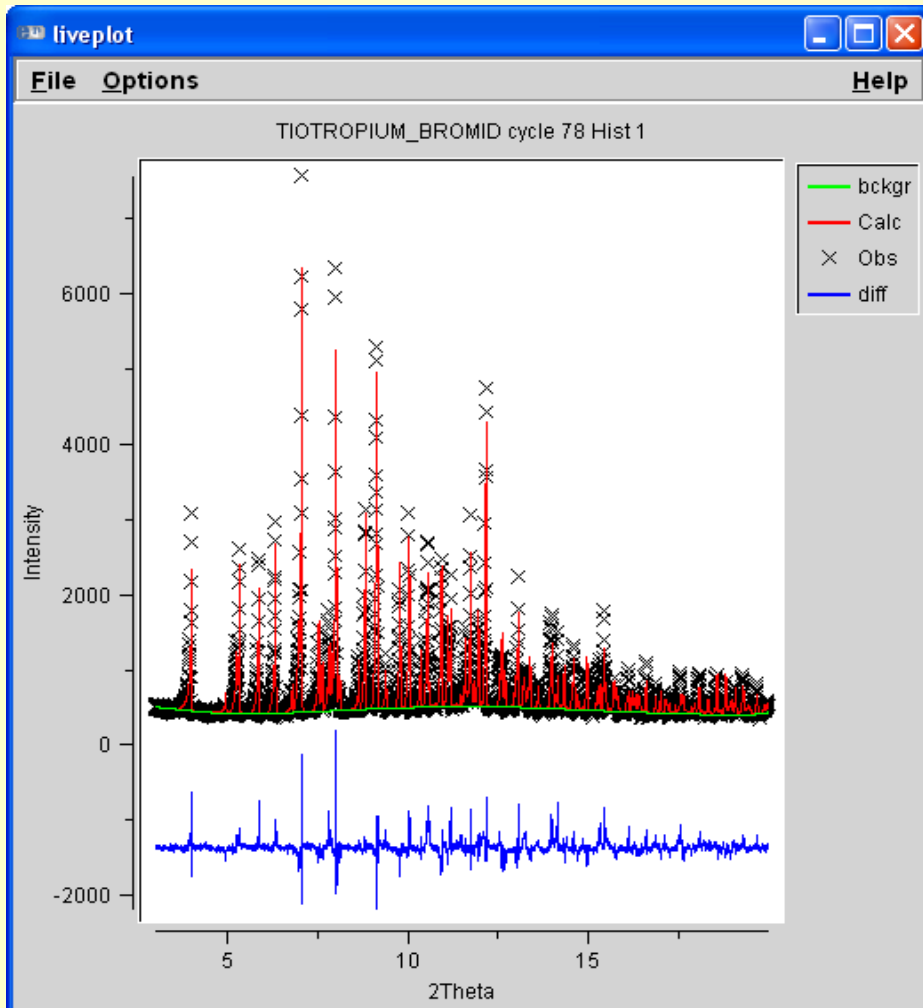
struktura, DOF = 20



Struktura z prášku je méně přesná než z monokrystalu a navíc je řešení omezeno hodnotou DOF (Degrees of Freedom) ≈ 30 , ale primárním produktem průmyslu je prášek

Tiotropium bromide - (14 DOF)

anticholinergic bronchodilator



Stanovili jsme krystalovou strukturu správně ??

Matematická kritéria posouzení kvality struktury – R-faktory
spolehlivosti

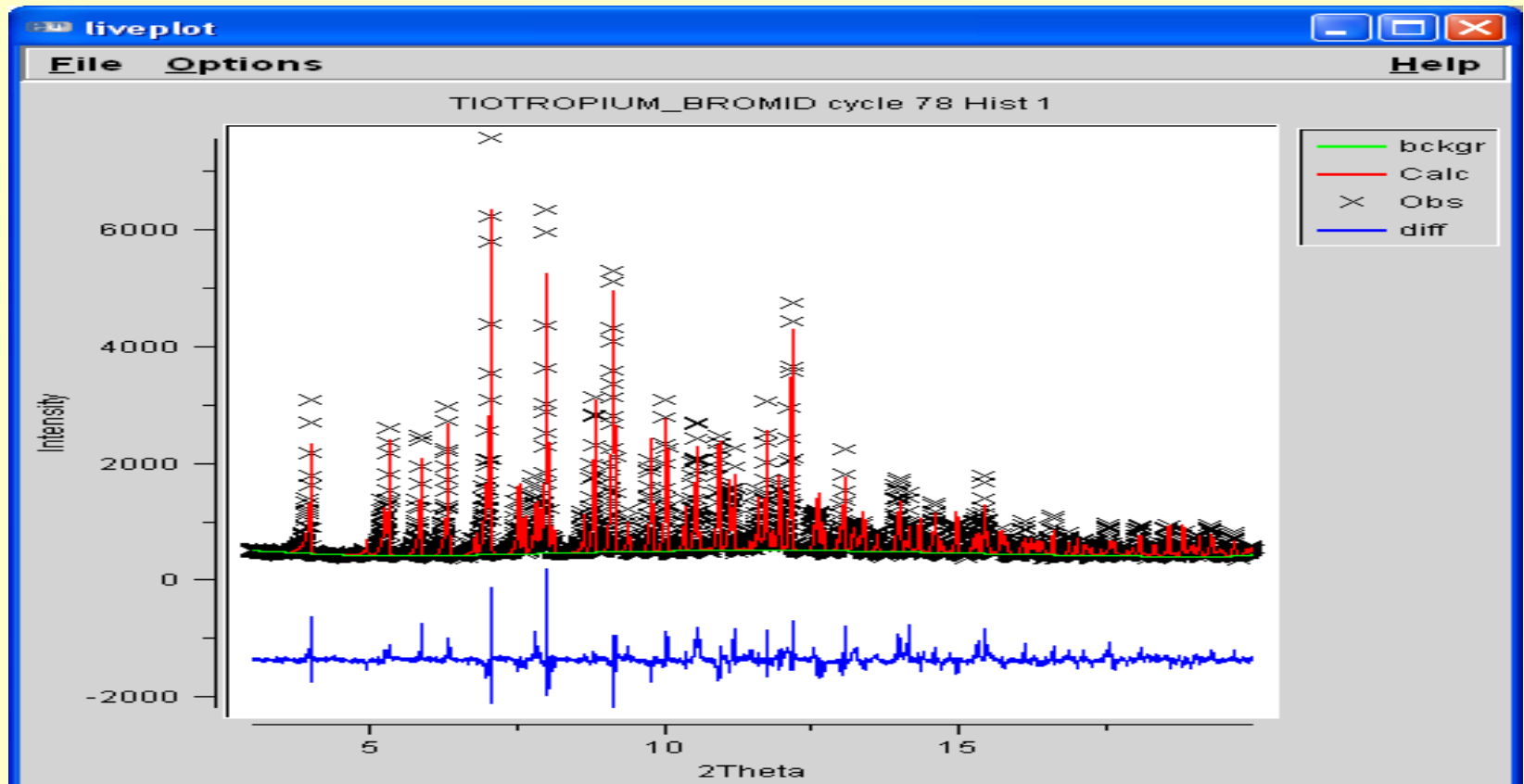
- $R_{int} = \sum |I_o - \langle I_c \rangle| / \sum I_o$
- $R = \sum (|F_o| - |F_c|) / \sum |F_o|$
- $R_1 = \sum (|F_o| - |F_c|) / \sum |F_o|$, kde $F_o > 2 \sigma(F_o)$
- $wR_2 = \{ \sum [w (F_o^2 - F_c^2)^2] / \sum [w (F_o^2)^2] \}^{1/2}$

o – observed (experimental) data; c – calculated data

Za spolehlivě určenou strukturu se dnes považuje hodnota R-faktoru do 0,08 (8%)

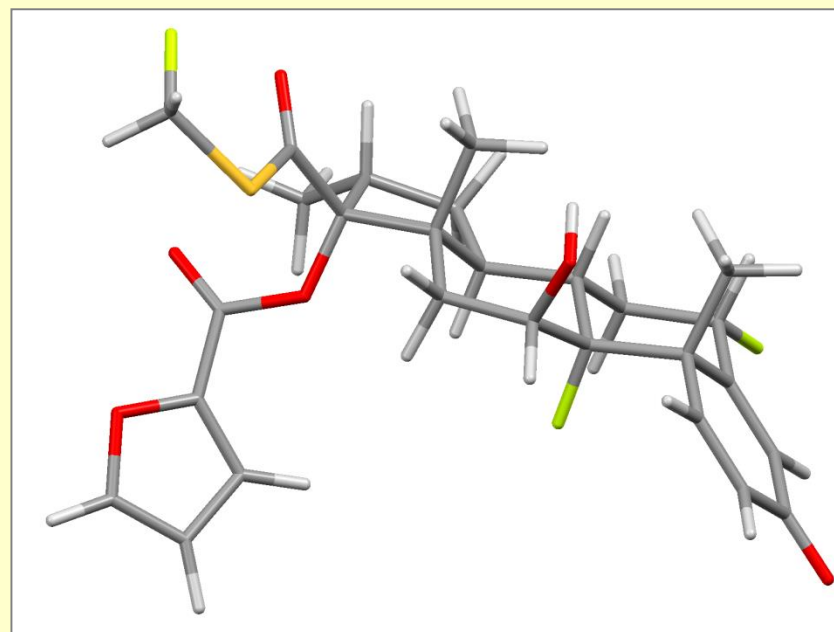
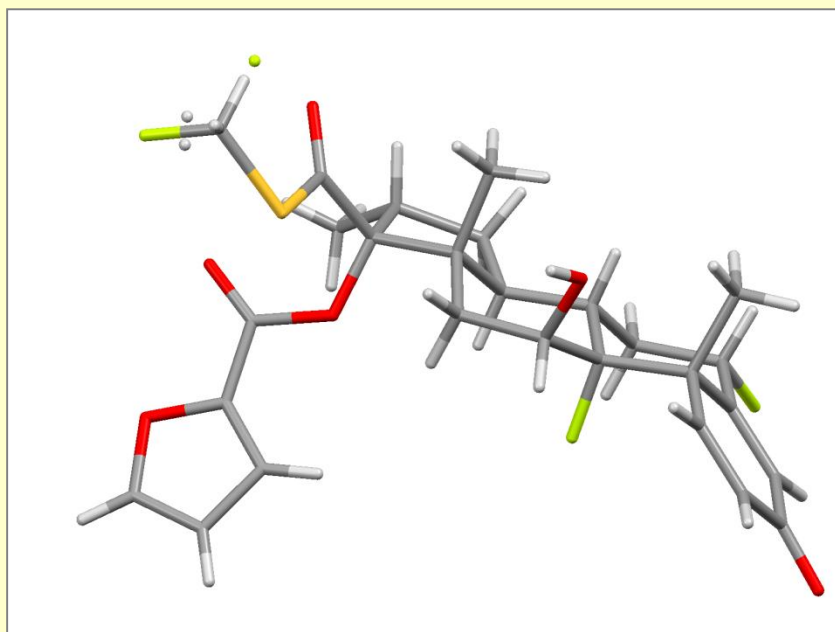
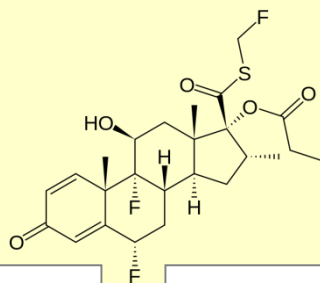
Stanovili jsme krystalovou strukturu správně ??

Porovnání změřeného RTG práškového záznamu (*obs*) a práškového záznamu vypočteného ze stanoveného strukturního modelu (*calc*):



Srovnání struktury z monokrystalu a z prášku

Fluticason (léčba astmatu)



Vyřešená struktura fluticasonu: vlevo z monokrystalu, vpravo z prášku

Řešení krystalové struktury z prášku má svá omezení a je méně přesné než z monokrystalu - ale primárním produktem výroby je prášek !

Standardní uložení výsledků RTG strukturní analýzy



Crystallographic Information File

<http://bioportal.weizmann.ac.il/iucr-top/cif/index.html>



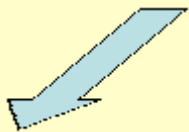
Příklad

```
data_TOZ_audit_creation_date 91-03-20 _chemical_name_systematic ;trans-3-Benzoyl-2-(tert-butyl)-4-
(iso-butyl)-1,3-oxazolidin-5-one ; _chemical_formula_sum 'C18 H25 N O3' _cell_length_a 5.959(1)
_cell_length_b 14.956(1) _cell_length_c 19.737(3) _cell_angle_alpha 90 _cell_angle_beta 90
_cell_angle_gamma 90 loop__reflns_scale_group_code _reflns_scale_meas_F 1 .960926 loop_
_symmetry_equiv_pos_as_xyz +x,+y,+z 1/2-x,-y,1/2+z 1/2+x,1/2-y,-z -x,1/2+y,1/2-z loop_
_atom_type_symbol _atom_type_number_in_cell _atom_type_scatter_dispersion_real
_atom_type_scatter_dispersion_imag C 72 .017 .009 H 100 0 0 O 12 .047 .032 N 4 .029 .018 loop_
_atom_site_label _atom_site_fract_x _atom_site_fract_y _atom_site_fract_z _atom_site_test_rubbish #
requested item not present _atom_site_thermal_displacement_type _atom_site_U_iso_or_equiv O1 .4154(4)
.5699(1) .3026(1) ? Uani .060(1) C2 .5630(5) .5087(2) .3246(1) ? Uani .060(2) C3 .5350(5) .4920(2)
.3997(1) ? Uani .048(1) N4 .3570(3) .5558(1) .4167(1) ? Uani .039(1) C5 .3000(5) .6122(2) .3581(1) ? Uani
.045(1) O21 .6958(5) .4738(2) .2874(1) ? Uani .090(2) C31 .4869(6) .3929(2) .4143(2) ? Uani .059(2) C32
.2552(7) .3558(2) .3953(2) ? Uani .073(2) C321 .209(1) .3542(4) .3211(3) ? Uani .111(4) C322 .230(1)
.2626(3) .4264(3) ? Uani .149(5) C41 .2034(4) .5476(2) .4682(1) ? Uani .041(1) H321C .04(1) .318(3)
.320(2) ? Uiso .14000 H322A .25(1) .272(4) .475(3) ? Uiso .19000 H322B .34976 .22118 .40954 ? Uiso
.19000 H322C .08(1) .234(4) .397(3) ? Uiso .19000 H412 -.007(6) .447(2) .552(2) ? Uiso .08000 H513B
.115(7) .757(3) .426(2) ? Uiso .09000 H513C .329(6) .817(2) .430(2) ? Uiso .09000 loop__refln_index_h
_refln_index_k _refln_index_l _refln_F_meas _refln_F_sigma _refln_observed_status
_refln_scale_group_code
```

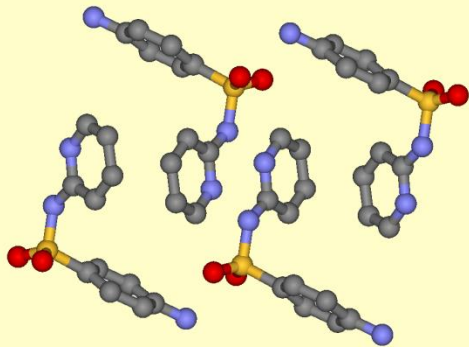
Příklady využití RTG strukturní analýzy ve farmacii

Proč řešíme struktury farmaceutických molekul a biomakromolekul :

- strukturní charakterizace farmakoforu (struktura vs. vlastnosti)
- strukturní charakterizace mechanismu účinku (návrh nových léků)
- strukturní identifikace pevné formy (polymorfu)
- mapování výskytu možných solventů (hydrátů)
- farmaceutická dokumentace
- důkazy v patentových soudních sporech



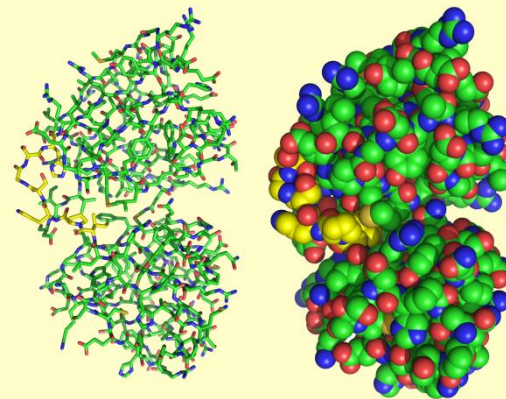
RTG strukturní analýza malých molekul
(do 1 000 atomů v molekule)



molekulární krystaly - léčiva



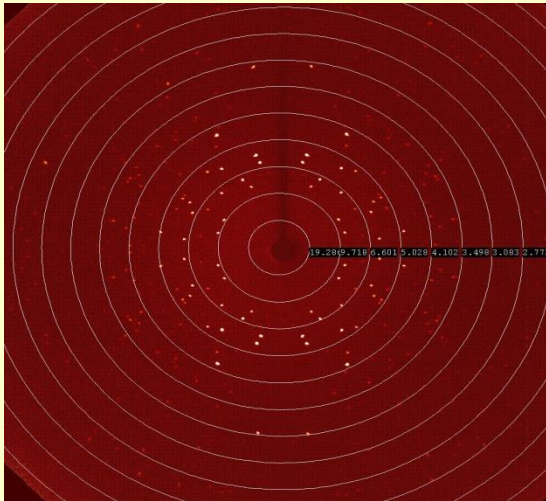
RTG proteinová krystalografie (např.
ribosom obsahuje okolo 64 000 atomů)



biomakromolekuly - bioléčiva

Stanovení absolutní a relativní chiralidy RTG difrakcí

Stanovení absolutní chiralidy je možné pouze u enantiomeru, protože krystaluje v polární prostorové grupě (nemá střed symetrie ani jiné operace symetrie, které jej zahrnují - 65 polárních PG z celkových 230 PG). U racemátu je možné určit pouze relativní chiralitu (krystaluje v centrosymetrické PG).



„Normální“ rozptyl: $I(hkl) = I(\bar{h} \bar{k} \bar{l})$, Friedelův zákon
atomový rozptylový faktor je reálné číslo

„Anomální“ rozptyl: $I(hkl) \neq I(\bar{h} \bar{k} \bar{l})$
atomový rozptylový faktor je komplexní číslo

Důvod anomálního rozptylu: rezonanční frekvence (frekvence elektronu v atomu rezonuje s frekvencí dopadajícího RTG svazku). Anomální rozptyl závisí na velikosti atomu a použité vlnové délce dopadajícího RTG svazku

Testy pro stanovení absolutní chiralilty:

Hamiltonův R-faktor test, Rogersův parametr η ,

Flackův parametr x

$$|F(\mathbf{h}, x)|^2 = (1 - x) |F_{\mathbf{h}}|^2 + x |F_{-\mathbf{h}}|^2$$

Zkrácená notace: $F_{\mathbf{h}} \equiv F_{\mathbf{hkl}}$

Kritérium: $x=0$ správně, $x=1$ opačně

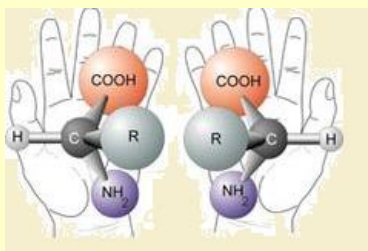
Úspěšnost stanovení absolutní chiralilty:

Absolutní chiralita: předpokladem je těžký atom ve struktuře

Relativní chiralita: pouze lehké atomy (C,N,O,H)

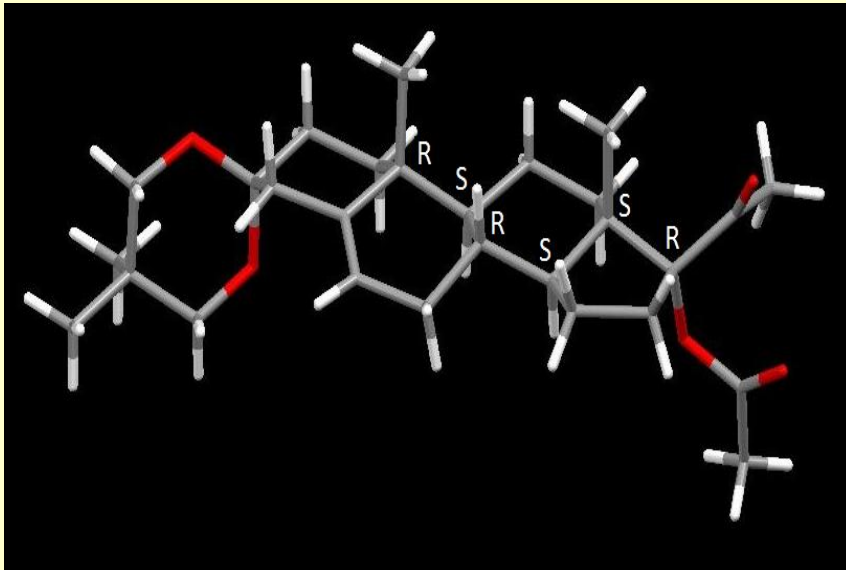
Absolutní chiralita centra: je-li přítomen atom o známé chiralitě, pak podle něho přiřadíme absolutní chiralitu celému centru

Kontrola chirální čistoty molekul

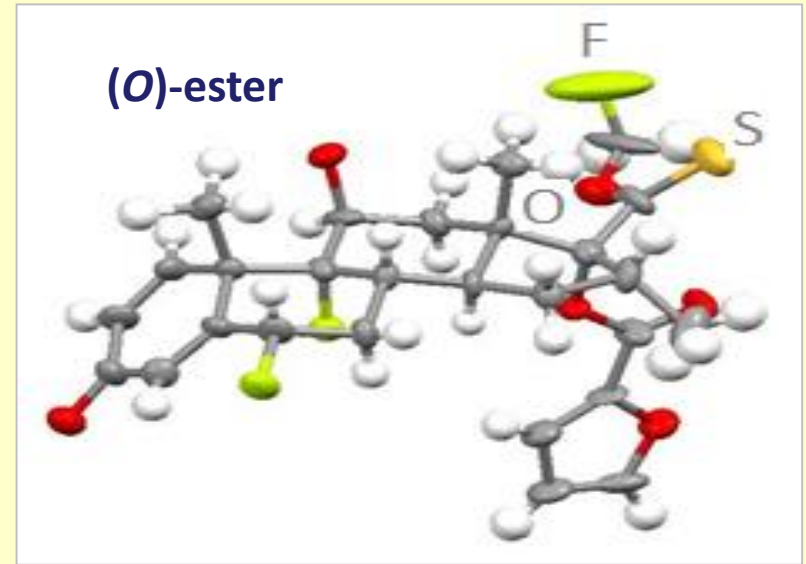


- kontrola správné chiralitý vstupních surovin
- kontrola zda při mnohastupňových organických syntézách nedochází k nečekané změně chiralitý meziprojektu (finálního produktu)
- kontrola, zda při stereoselektivní syntéze nedochází k racemizaci meziprojektu (produktu)
- lokalizace příp. změny chiralitý u molekul s více chirálními centry
- určení absolutní konfigurace v případě kdy ji lze určit jen velmi obtížně z NMR (např. z důvodu oddělení spinových systémů heteroatomy)

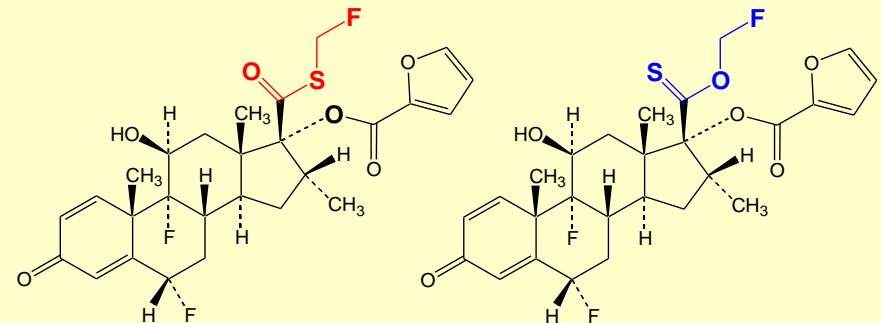
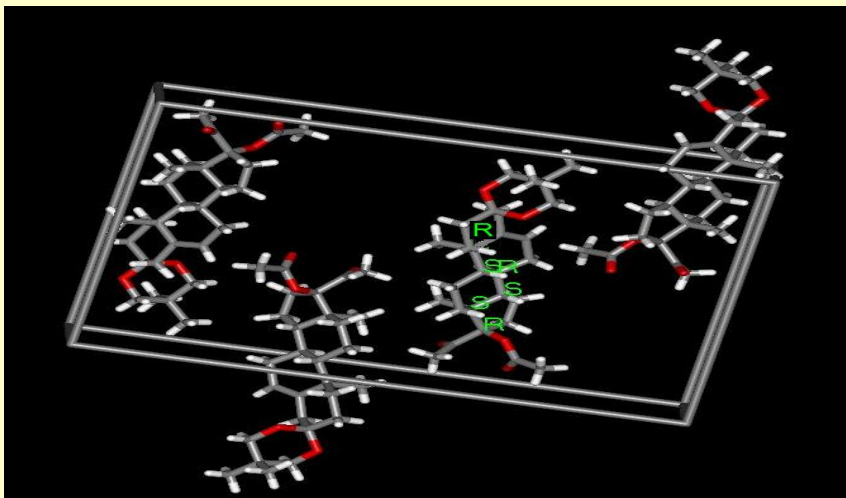
Určení absolutní chirality z RTG difrakčních dat



Intermediát syntézy steroidních léčiv

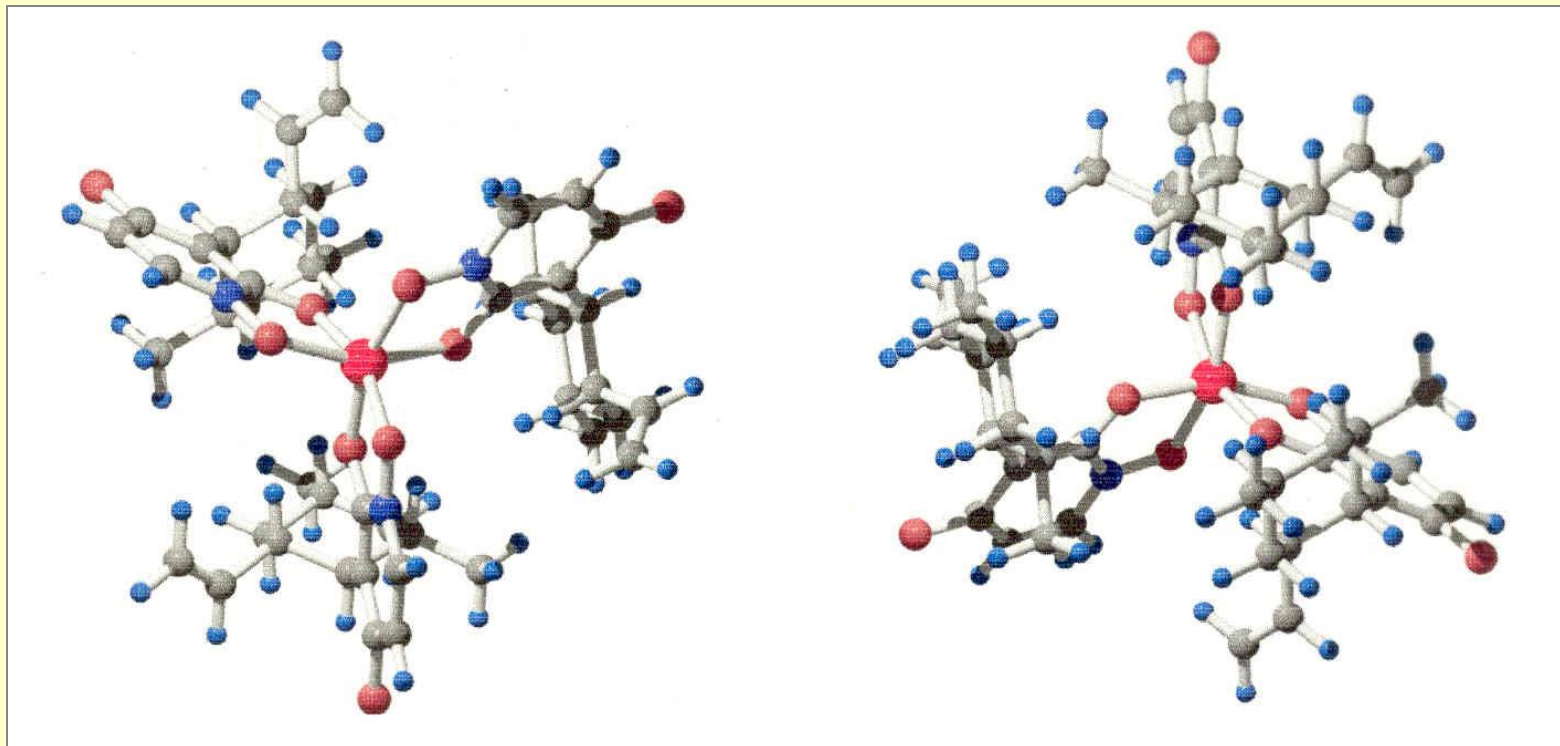


Nečistota fluticasonu furoátu - dvě možnosti:
(O)-ester nebo (S)-ester thiokyseliny?



Terricolin $[\text{FeL}_3] \cdot 2\text{MeOH}$ – nežádoucí pigmentová nečistota Cs A

HL = (1S,2R,4S,6R)-3-(2',4'-dimethyl-6'-vinylcyklohexyl)-1,4-dihydroxy-2(1H)-pyridon
stanovení absolutní chiralita z RTG difrakčních dat



Δ -cis R=0,057 x=0.97(4)

Δ -cis R=0,052 x=0.03(4)

správně

Krystalografická data terricolinu:

a = 20,27(3) Å

$\lambda(\text{MoK}\alpha) = 0,7107 \text{ Å}$

b = 19,35(4)

$D_c = 1,141 \text{ g.cm}^{-3}$

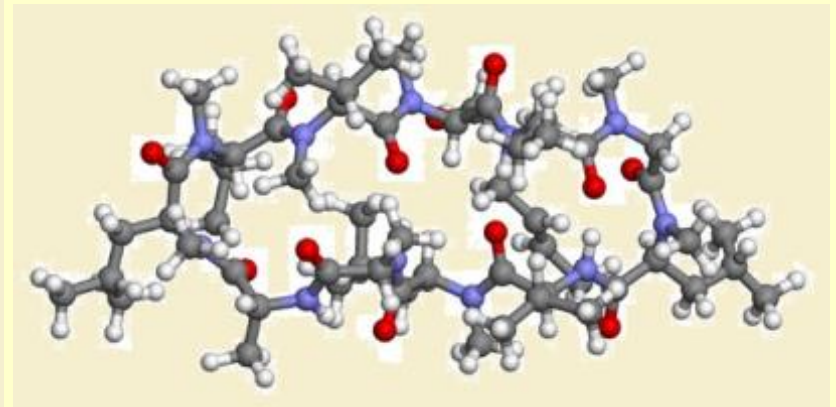
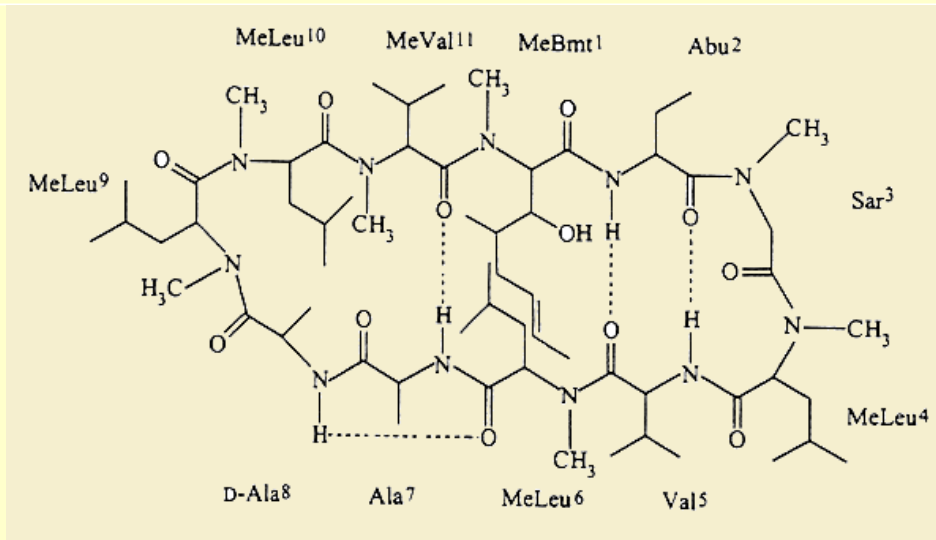
c = 13,43(4)

PG $P2_12_12$

V = 5268(2) Å³

Z = 4

Imunosupresivum – cyklosporin A (Cs A)



Cyklosporin A a konformace jeho molekuly



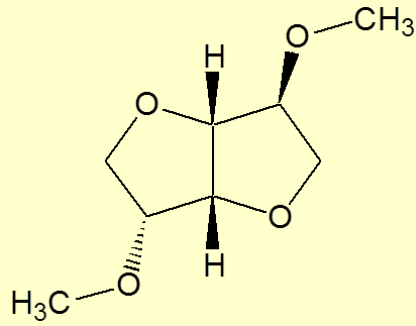
Léčivý přípravek Equoral



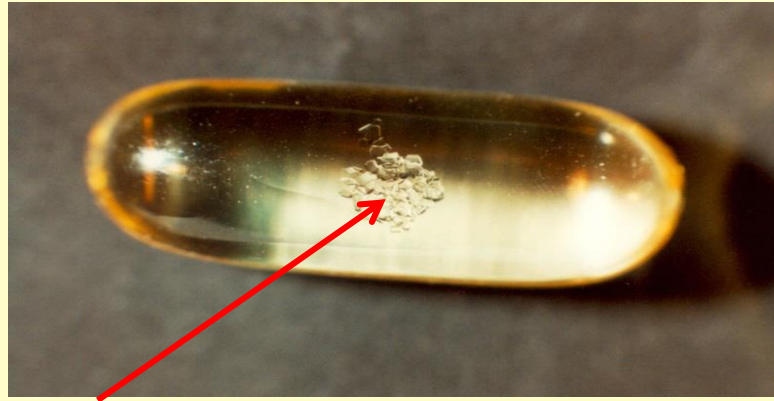
Měkké želatinové tobolky uzavírající průzračnou substancí



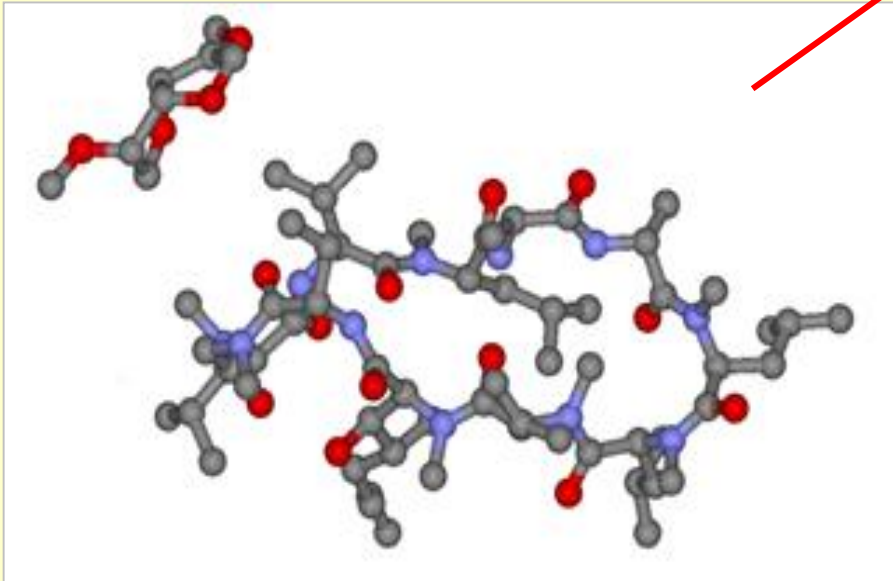
Identifikace krystalické fáze v tobolce Equoralu metodou monokrystalové RTG difrakce



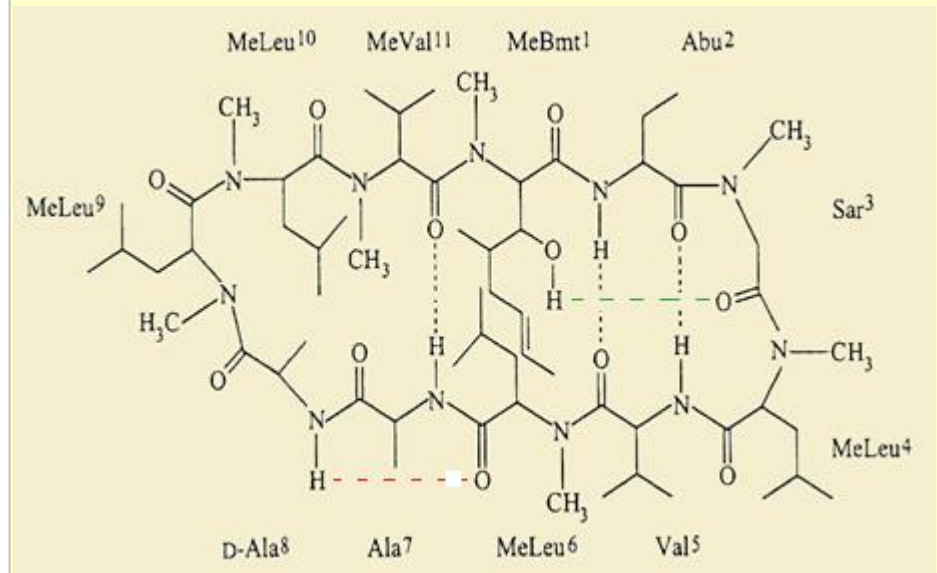
Dimethylisorbid (DMI) – uvažovaná komponenta do mikroemulze



Nežádoucí krystalická fáze v tobolce

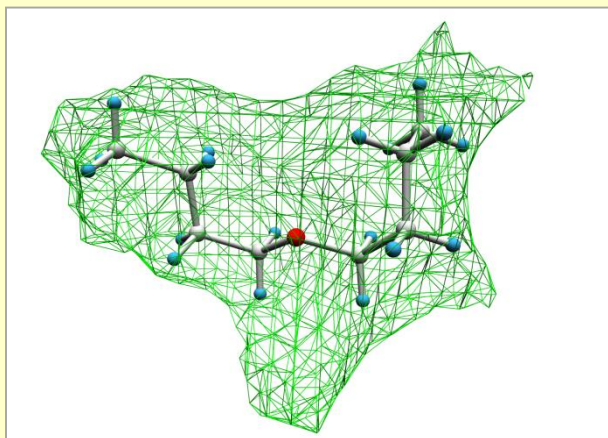
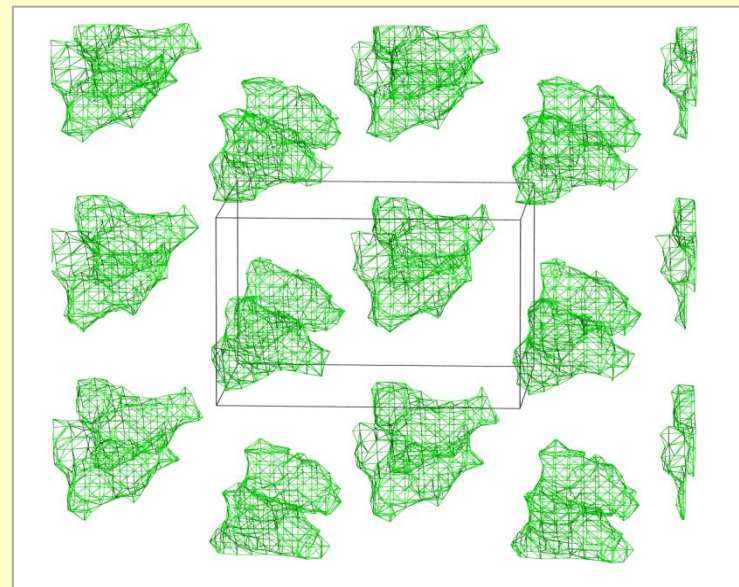
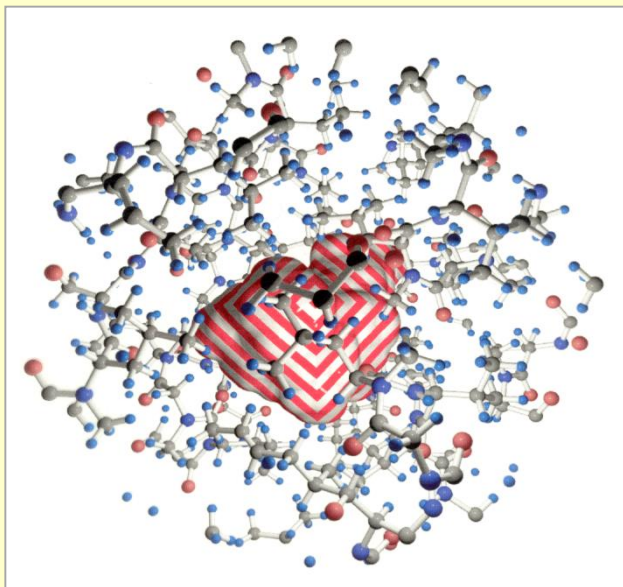


Krystalický Cs A . DMI solvát



Změna konformace molekuly CsA.DMI proti CsA

Rozložení kavit ve strukturách cyklosporinů a modelování jejich možného zaplnění molekulami solventů

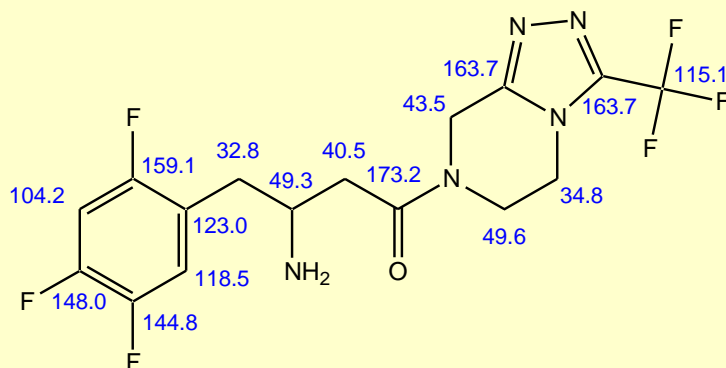


Vyplnění kavity molekulou
di-*n*-butyletheru

Kooperace práškové RTG difrakce a ss-NMR

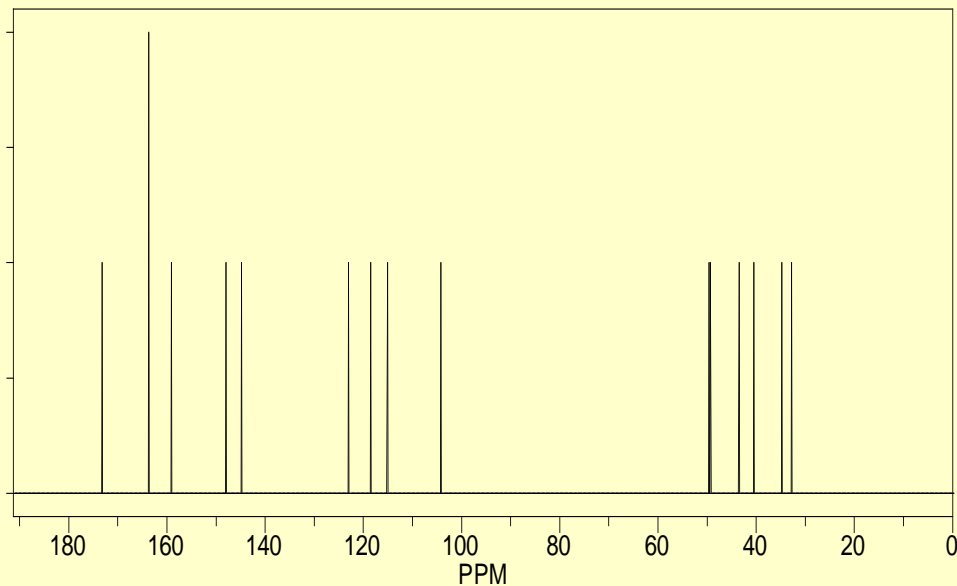


Léčba cukrovky



sitagliptin, Januvia (Merck)
(sitagliptin fosfát monohydrát)

sitagliptin sulfát
 $(C_{16}H_{15}F_6N_5O)_2 SO_4$
DOF = 30



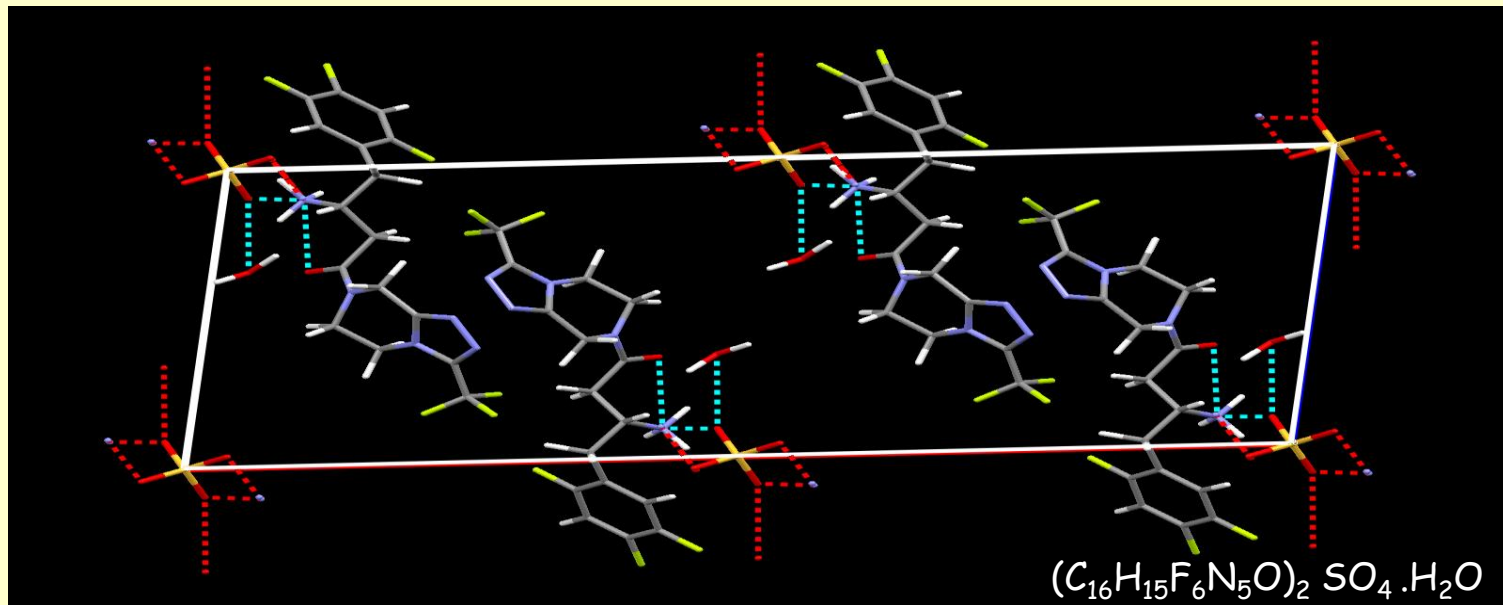
Na spektru ^{13}C ss-NMR je vidět pouze jednu molekulu sitagliptinu v asymetrické části el. buňky

řešeno ve spolupráci s J. Brusem

Struktura sitagliptinu sulfátu monohydrátu

Indexace práškových dat vede k: $a = 28,298$; $b = 6,033$; $c = 11,946$ Å;
 $\beta = 97,36^\circ$; grupa C2; $Z = 2$

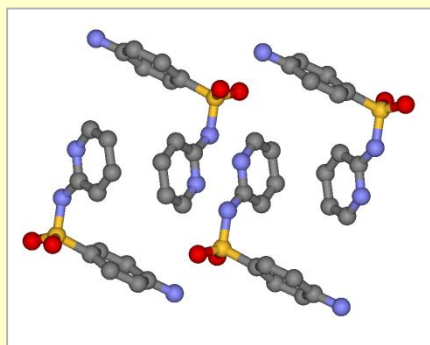
Řešení struktury v grupě C2 snižuje $\text{DOF} = 30$ na $\text{DOF} = 16$ (pozice S je fixovaná na 2 čtené ose) - strukturu lze řešit i z dat rutinního práškového difraktometru:



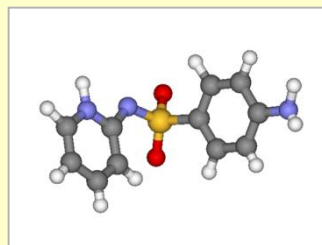
Pakování struktury zobrazené programem Mercury včetně systému H-vazeb (analýzou kavit ve struktuře byla ještě lokalizována přítomnost hydrátové vody)

Polymorfismus a polymorfy ve farmacii

Polymorfismus je schopnost API, ale i excipientů, tvořit různé pevné fáze (polymorfy), které se liší krystal. strukturou. Mezi polymorfy jedné entity existují polymorfní přechody. Polymorfy jedné entity se liší svými vlastnostmi (rozpuštěcí rychlostí, stabilitou, sorpcí vlhkosti, technolog. parametry atd.)

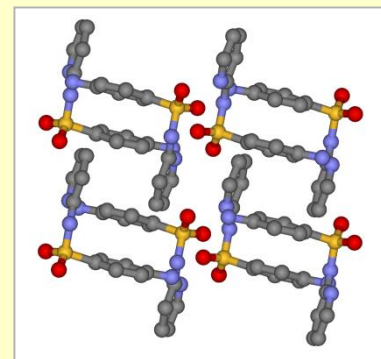


polymorf I

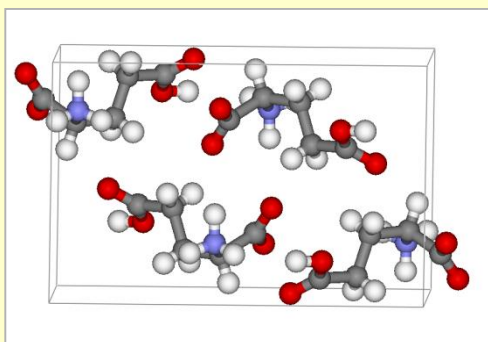


sulfapyridin

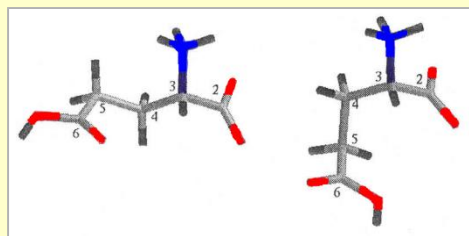
pakovací polymorfismus



polymorf II

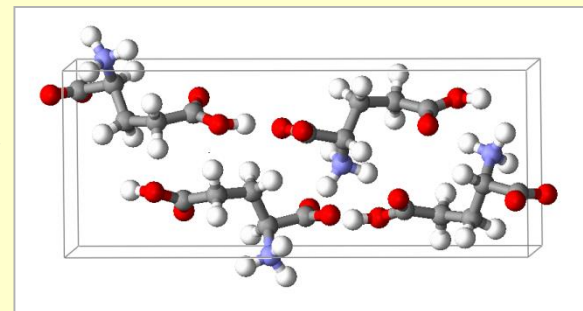


polymorf β



L - glutamová kyselina

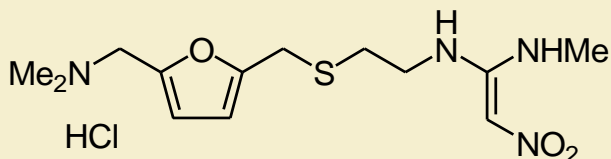
konformační polymorfismus



polymorf α



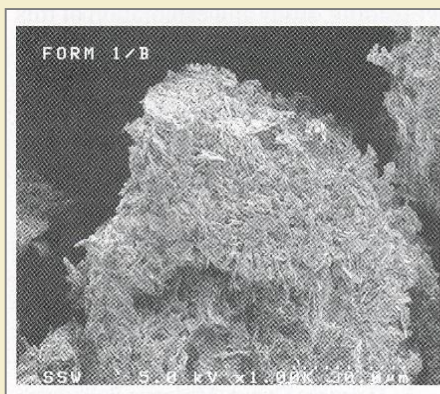
Detekce polymorfního systému metodou RTG práškové a monokrystalové difrakce



Ranitidin hydrochlorid (antiulcerosum)



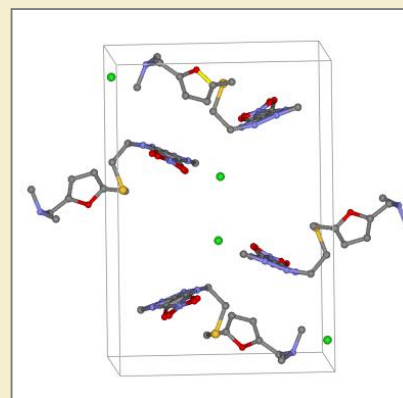
Polymorfismus – molekuly jednoho druhu se mohou složit do více krystalových struktur neboli polymorfů. Polymorfy se ve farmacii liší svojí rozpouštěcí rychlostí



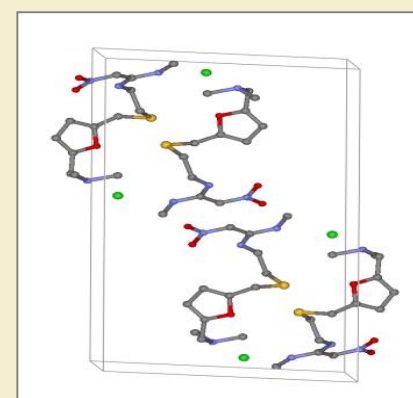
Polymorf I



Polymorf II



Polymorf I

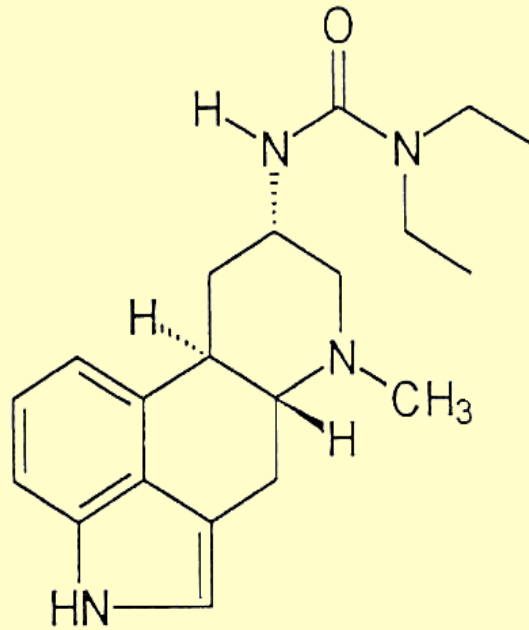


Polymorf II

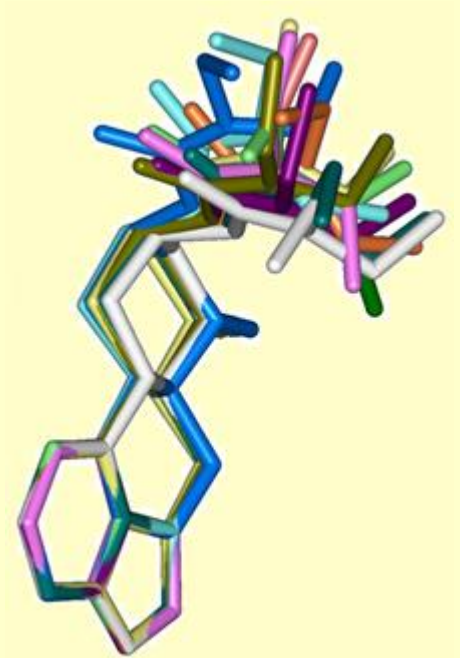
Řešení polymorfismu substance *trans*-D-terguridu



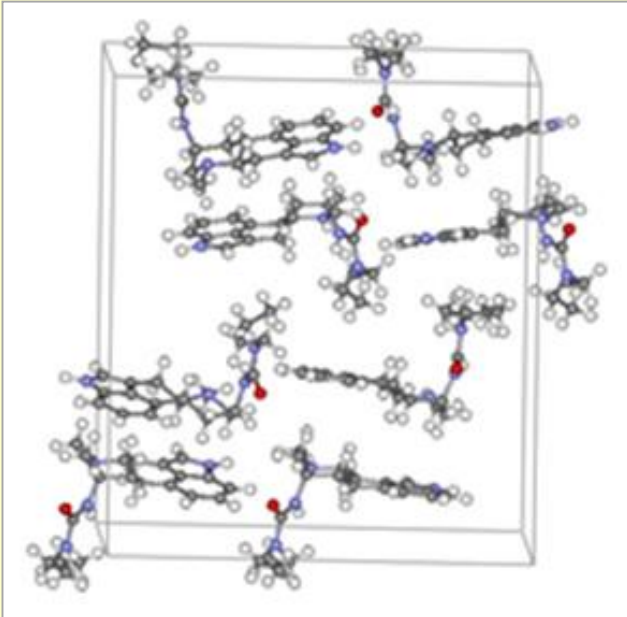
Námel (paličkovice nachová,
Claviceps purpurea)



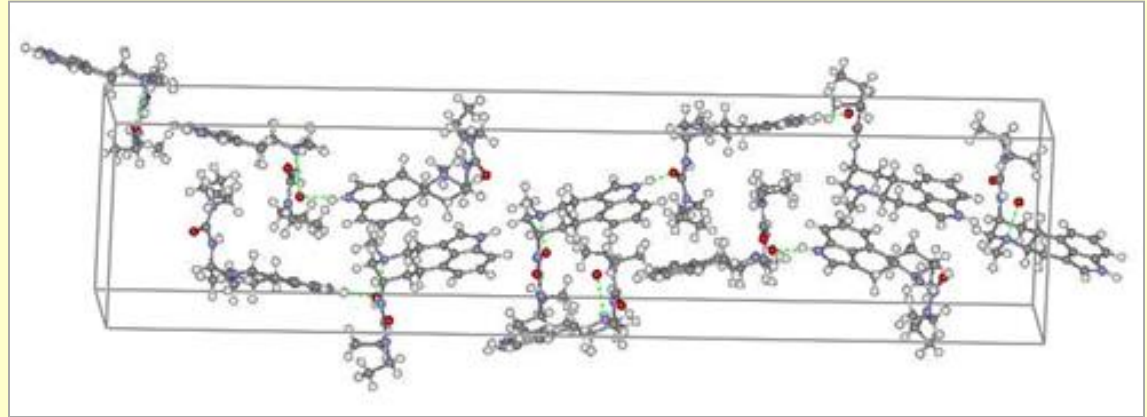
Trans-D-tergurid



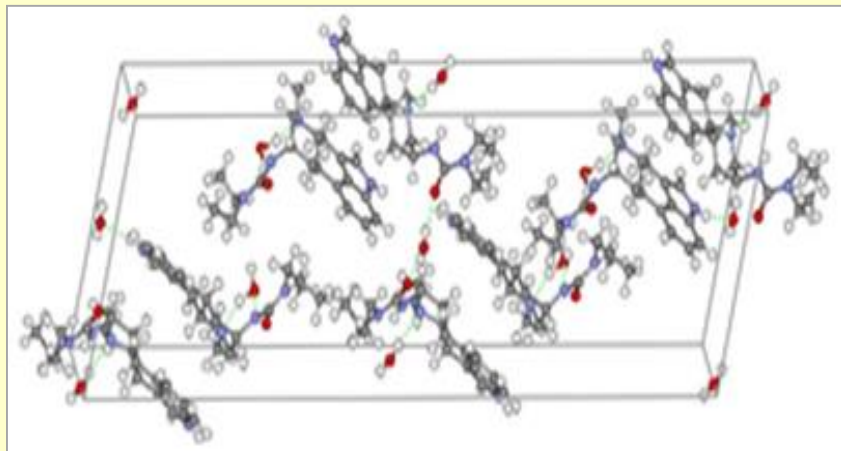
Polymorfismus substance *trans*-D-terguridu



Tergurid (forma C) – požadovaná fáze



Tergurid . 2/3 H₂O (forma A) - nečistota

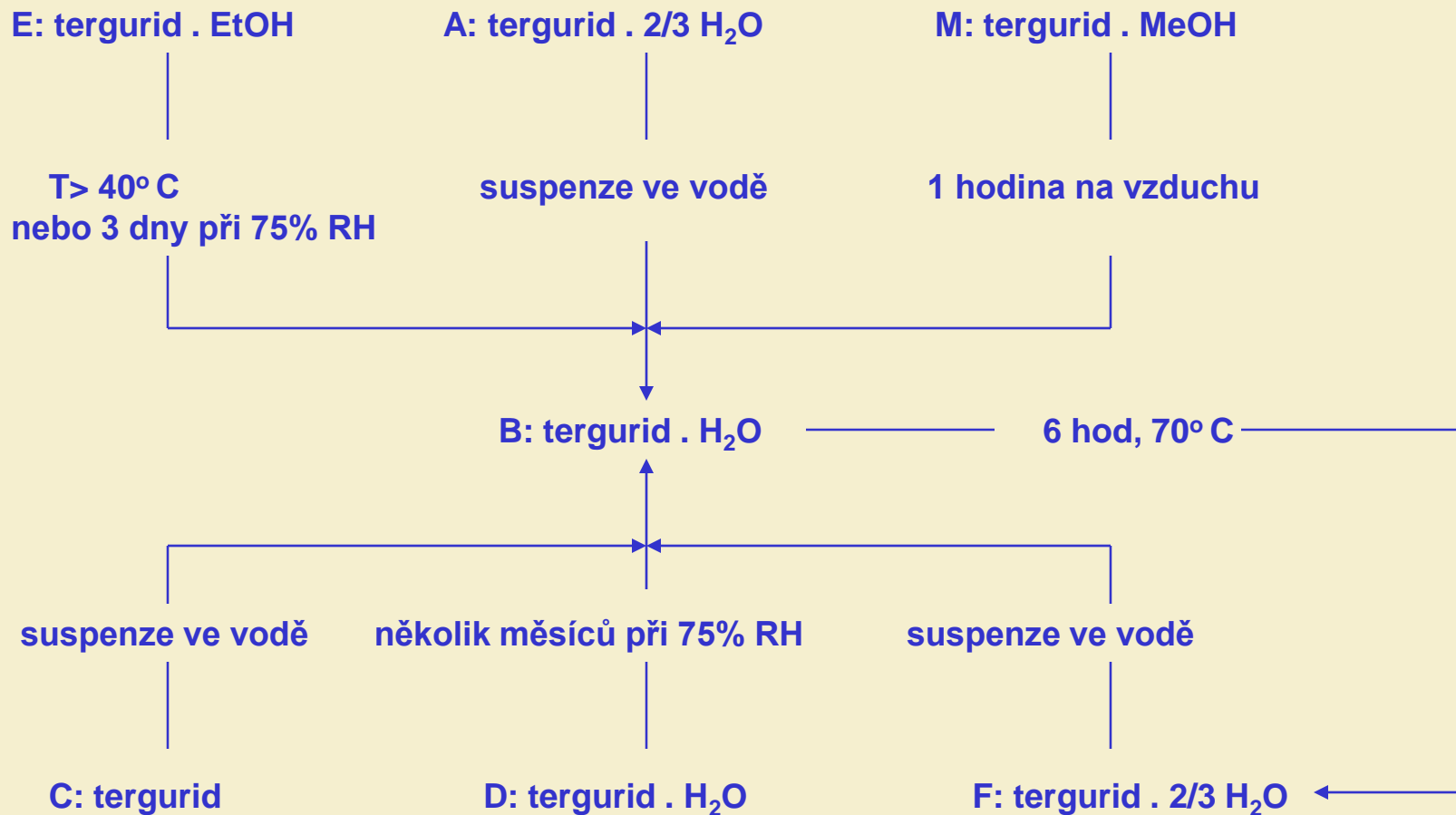
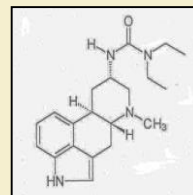


Tergurid . H₂O (forma B) - nečistota

Stabilní (nejstabilnější) formou v systému je B:

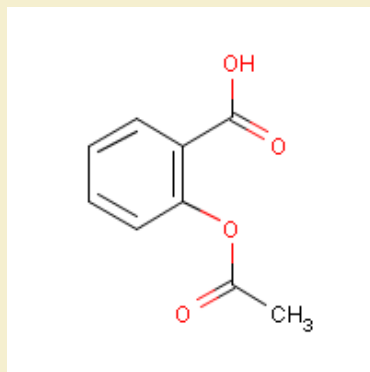
- formy A a C, za určitých podmínek, přechází na formu B
- o tom, která forma bude z roztoku krystalovat, rozhoduje velmi přísně obsah H₂O ve finálním rozpouštědle

Fázové transformace v systému *trans*-D-terguridu



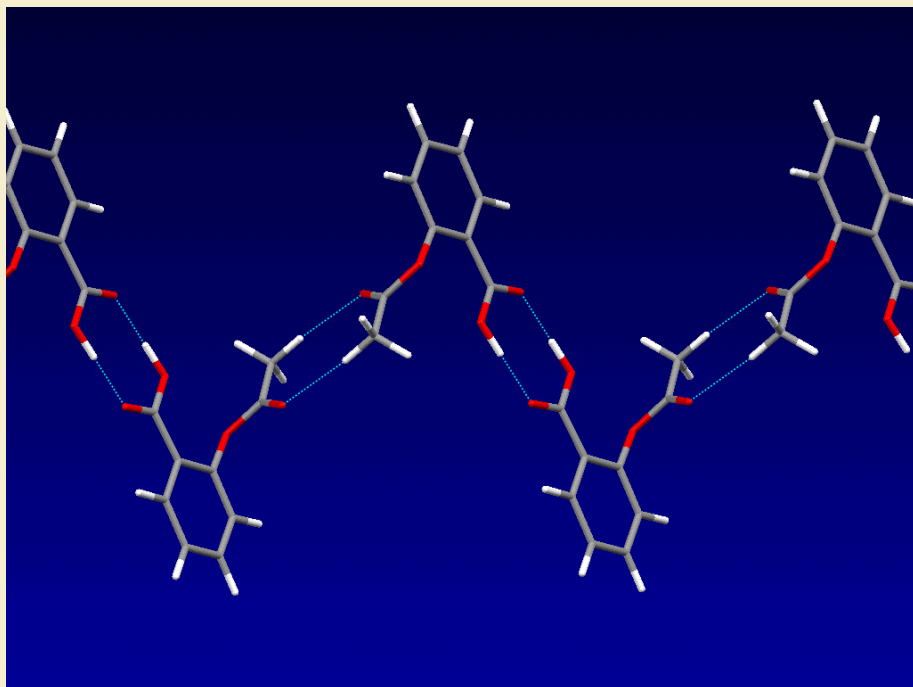
Stabilní fází v systému je monohdrát. Obecně ale neplatí, že solváty jsou stabilnější než ansolváty !!!

Příklady polymorfních systémů – teoreticky zajímavé a prakticky důležité

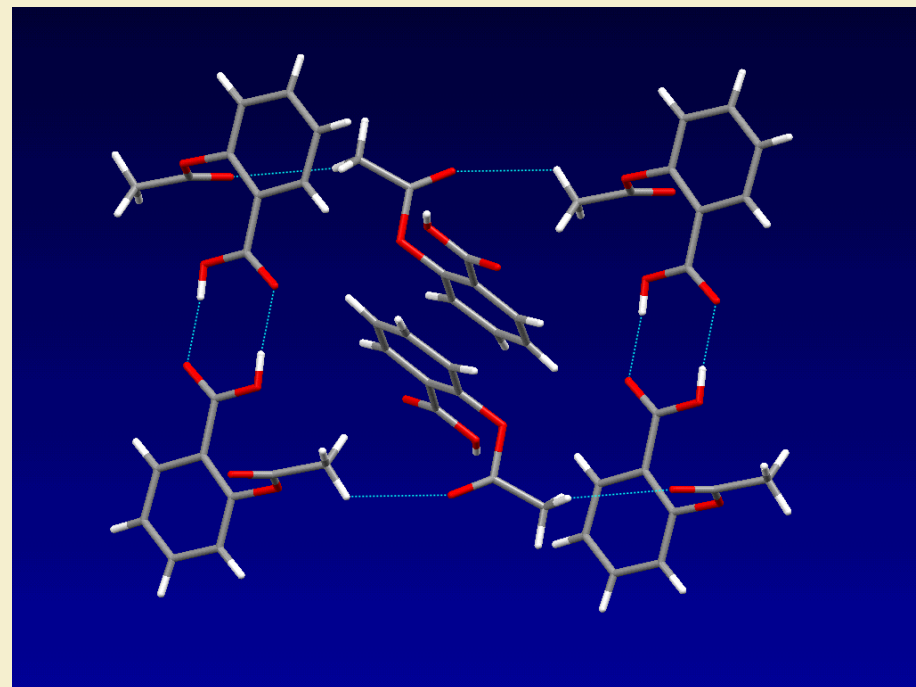


dimorfní kyselina
acetylsalicylová

Teoreticky zajímavé



Forma I



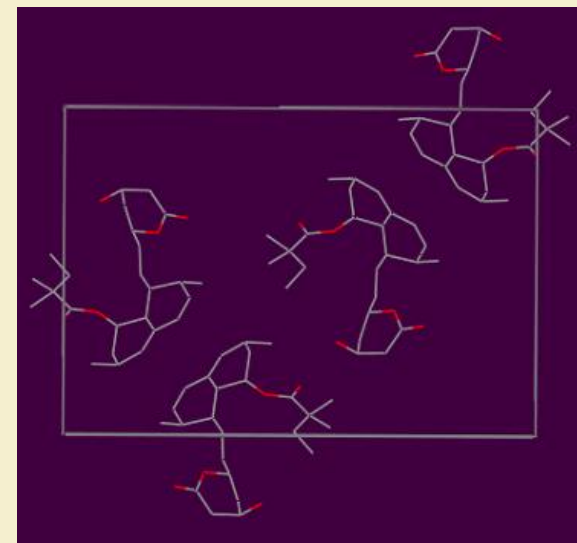
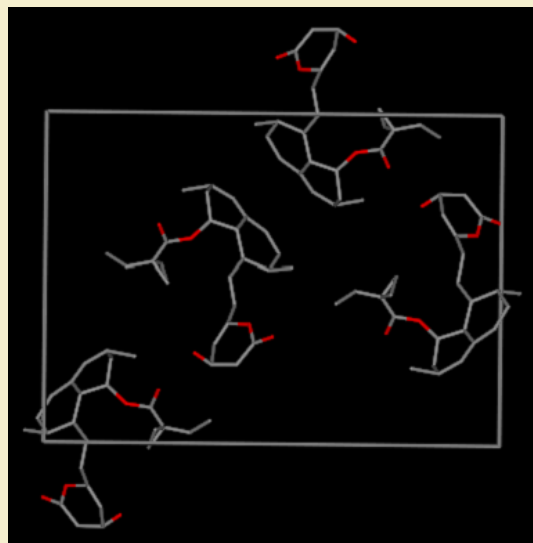
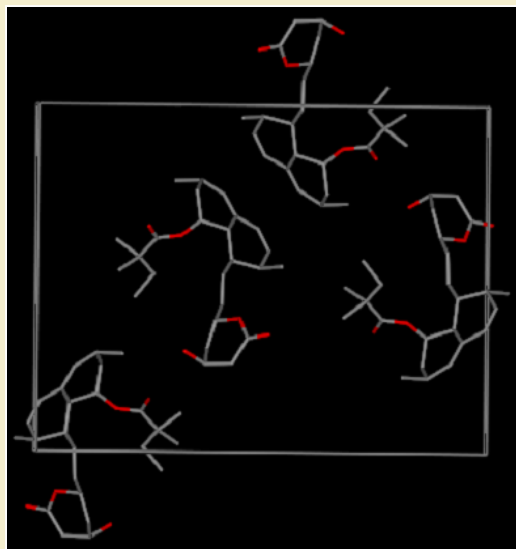
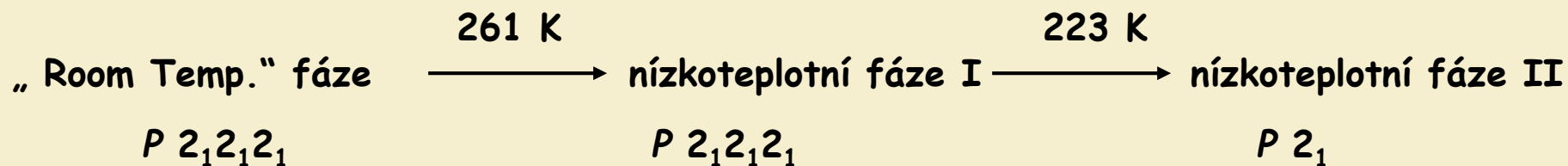
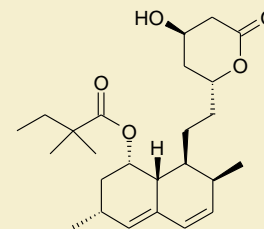
Forma II

Wishweshwar P. et al.:JACS 127, 16802 (2005).

Prakticky důležité a teoreticky zajímavé polymorfní systémy

Teoreticky zajímavé

Nízkoteplotní polymorfy simvastatinu:



Kombinace polymorfního složení

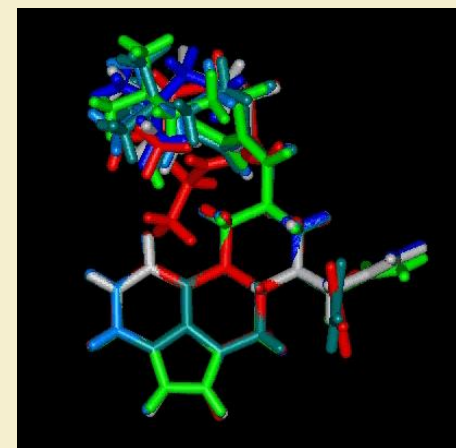
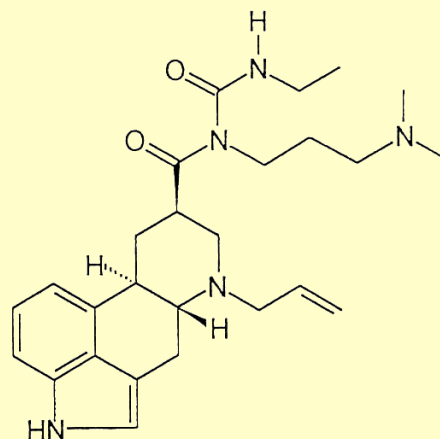
Dostinex, Pfizer (příbalová informace, PIL – neuvádí polymorfy):

Léčivou látkou je cabergolinum 0,5 mg v jedné tabletě. Excipienty jsou laktosa (plnivo, pojivo) a leucin (ochucovadlo)

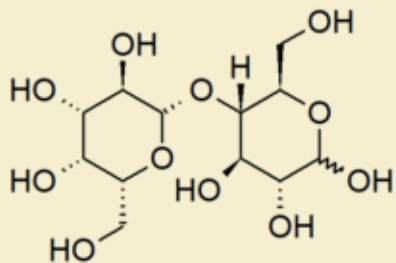


Cabergolin

**3 polymorfy
(I, II, VII)**



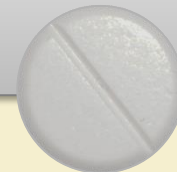
Lék pro regulaci tvorby mléka u žen



Laktosa

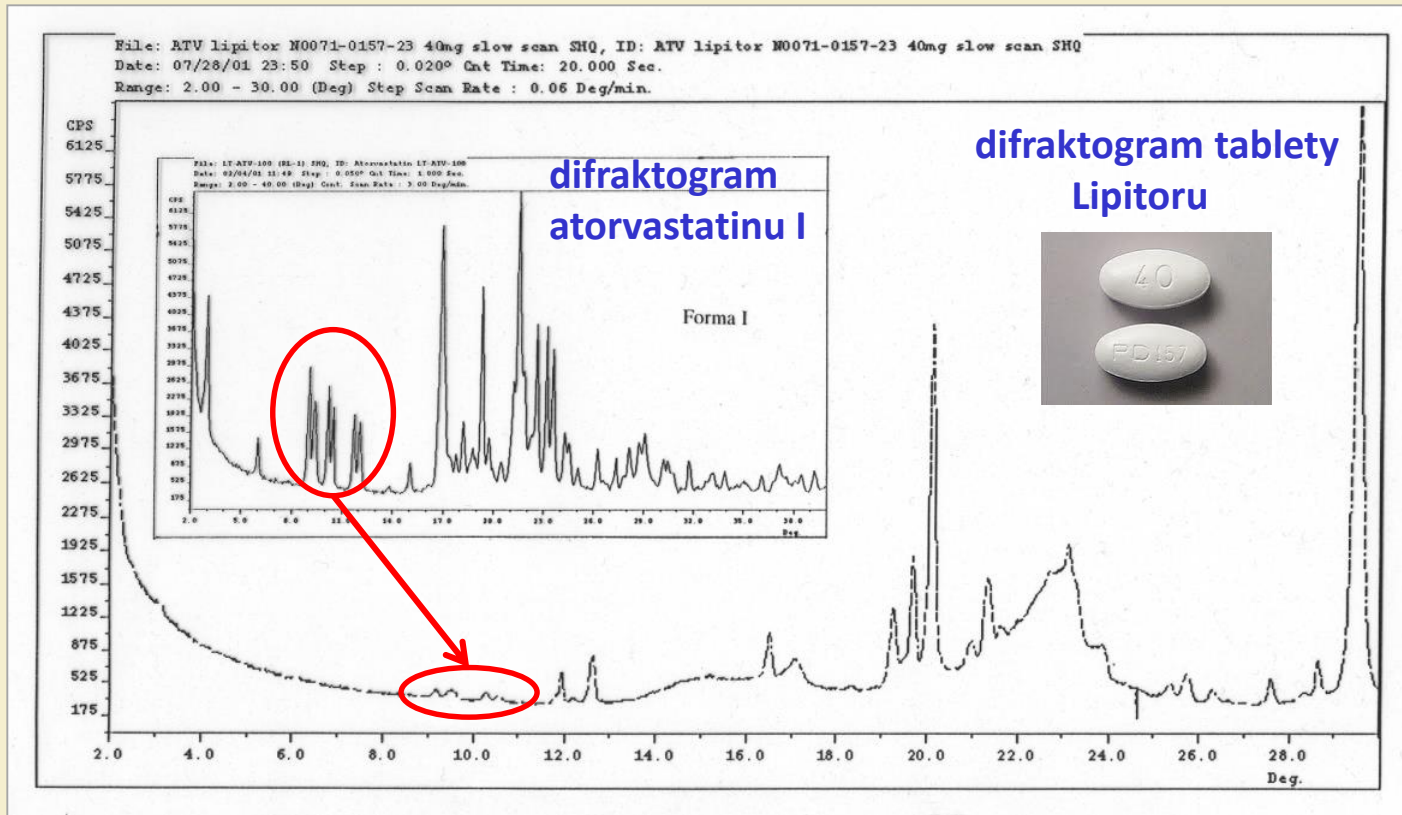
**2 polymorfy
(α , β)**

**Pro polymorfní složení
Dostinexu připadá v úvahu
6 kombinací !**





Reverzní inženýrství - identifikace polymorfů atorvastatinu vápenatého v tabletách konkurence

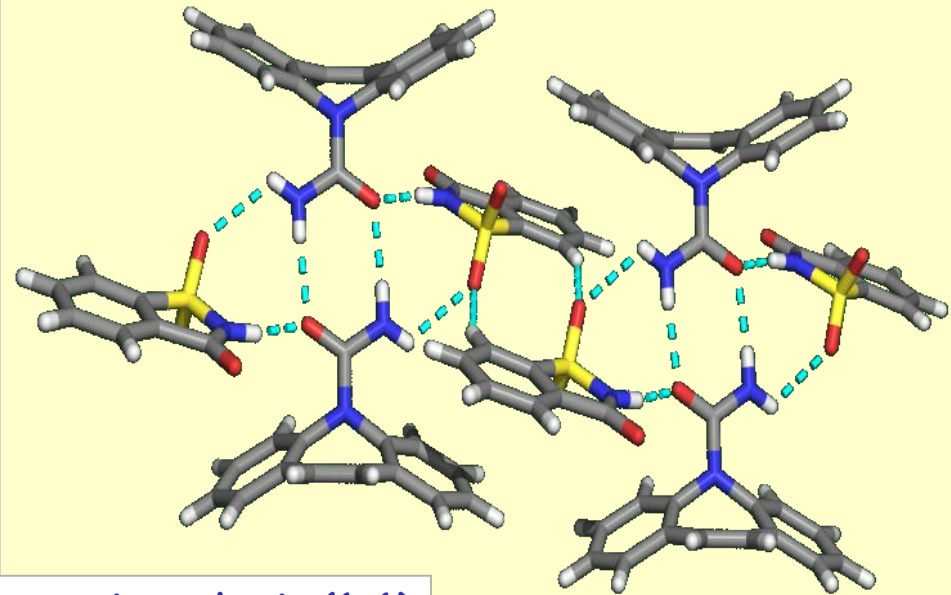
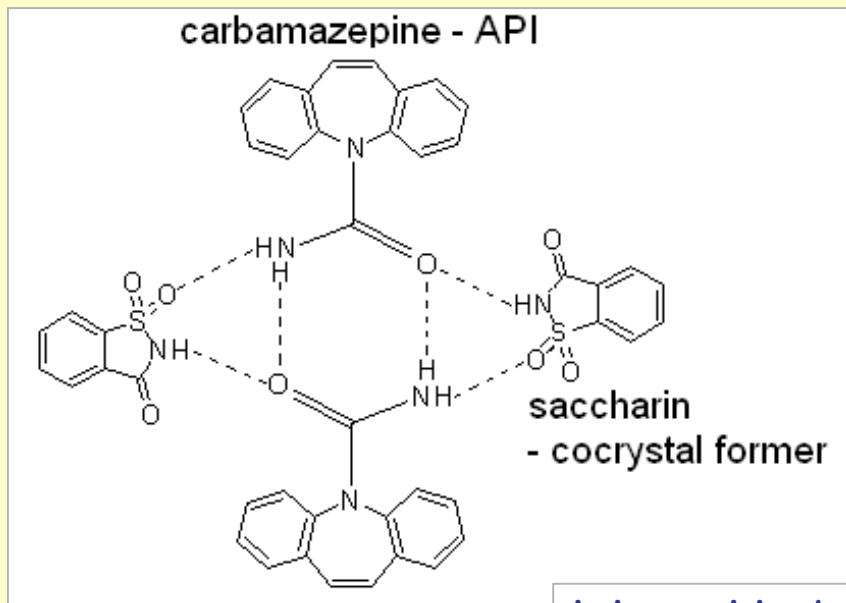


Difraktogram atorvastatinu: čistá forma I a forma I v tabletě (+ excipienty):

- uhličitan vápenatý
- mikrokrytalická celuloza
- laktosa
- sodná sůl karboxymethylcelulosity
- polysorbát
- hydroxypropylceluloza
- stearan hořečnatý)

Farmaceutický kokryystal

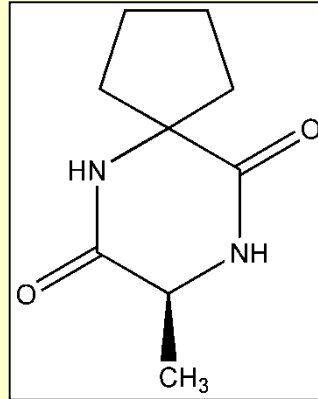
Farmaceutický kokryystal je stechiometrická multikomponentní sloučenina typu hostitel (aktivní molekula) : host (kokrystalizační partner), vytvořená ze dvou nebo více složek, které jsou v čistém stavu a za pokojové teploty pevné - **uznávaná definice C.B. Aakeröye**. Stechiometrický poměr hostitel : host je většinou jednoduchý (1:1, 2:1, 3:1, 4:1, resp. 1:4)



kokrystal karbamazepin:sacharin (1:1)

Aktivní molekula ve formě kokryystalu může výrazně zlepšit funkční a technologické parametry API

Predikce krystalových struktur - alaptid



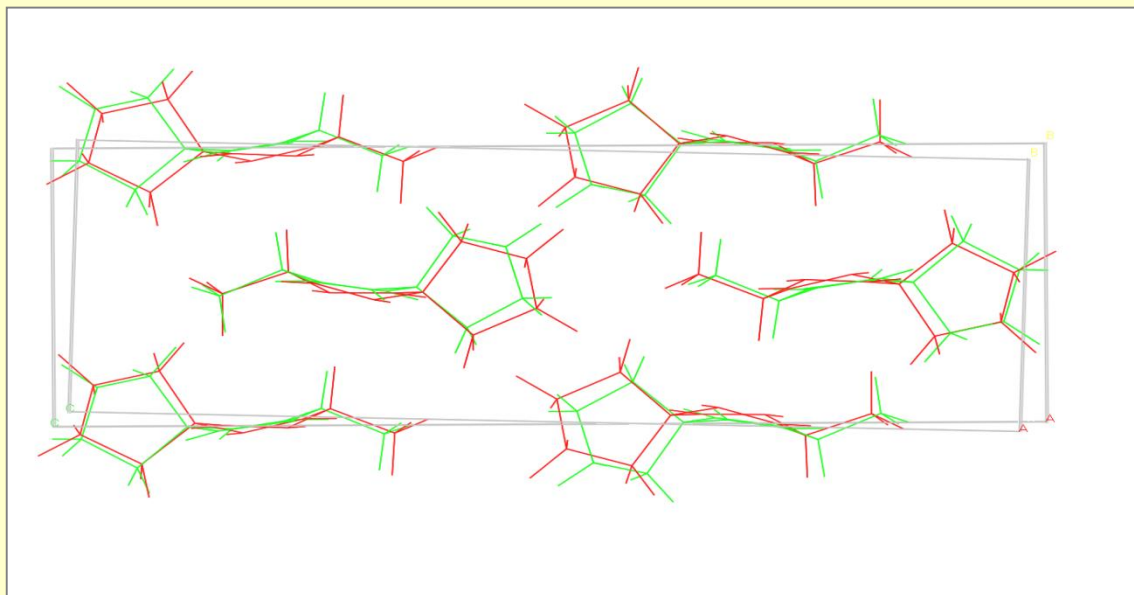
Alaptid je spirocyklický dipeptid [(8*S*)-8-methyl-6,9-diazaspiro[4,5]dekan-7,10-dion], $C_9H_{14}N_2O_2$, tvořený spojením pětičlenného a šestičlenného kruhu. Teplota tání 243-245 °C

Vlastnosti: rozpustnost: 1 mg alaptidu v 1 ml vody, 10 mg v 1 ml MeOH

Použití: ve formě veterinární masti na léčbu kožních a slizničních poranění, popálenin, odřenin, omrzlin, proleženin atd., potenciálně pro léčbu Alzheimerovy choroby a žaludečních vředů - **nízká rozpustnost ve vodě !**

Predikce krystalových struktur - alaptid

Pořadí dle energie	Celková energie dle pole COMPASS (kcal/mol)	Hustota (g/cm ³)	Prostorová grupa	V(Å ³)	a(Å)	b(Å)	c(Å)	β(°)
1	15,97	1,388	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	871,94	21,08268	6,24113	6,62667	90
2	16,70	1,366	P2 ₁	442,96	6,24871	6,60183	11,63131	112,605
3	16,76	1,371	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	882,58	16,01046	8,75008	6,300000	90
4	16,97	1,379	P2 ₁	438,97	6,16103	7,04354	10,21912	98,163
5	17,04	1,377	P2₁ 2₁ 2₁	879,22	20,19003	6,16983	7,05811	90
Exp. [40]		1,469	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	938,41(1)	21,14118(7)	6,14610(3)	7,22207(2)	90

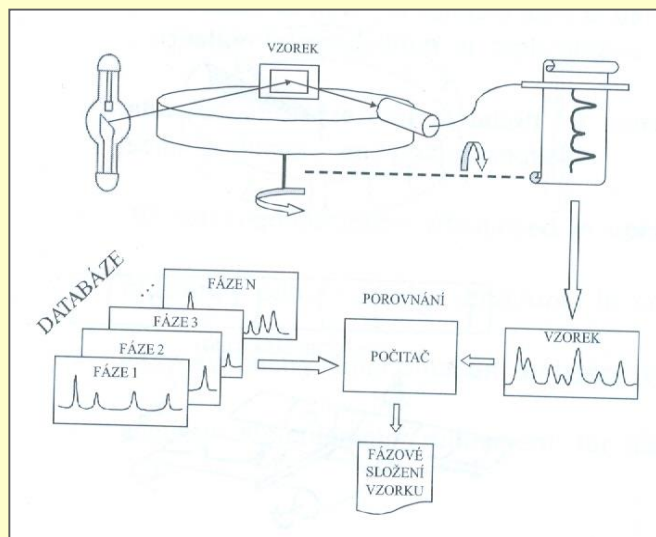


červeně - predikce,
zeleně - experiment

Aplikace v práškové RTG difrakční analýze

- kvalitativní a kvantitativní fázová analýza

- 1) Každá fáze poskytuje charakteristický difraktogram (hodnoty θ , resp. d a I)
- 2) Difraktogram směsi je superpozicí difraktogramů čistých fází
- 3) Intenzita difrakčních piků je úměrná množství fáze ve směsi

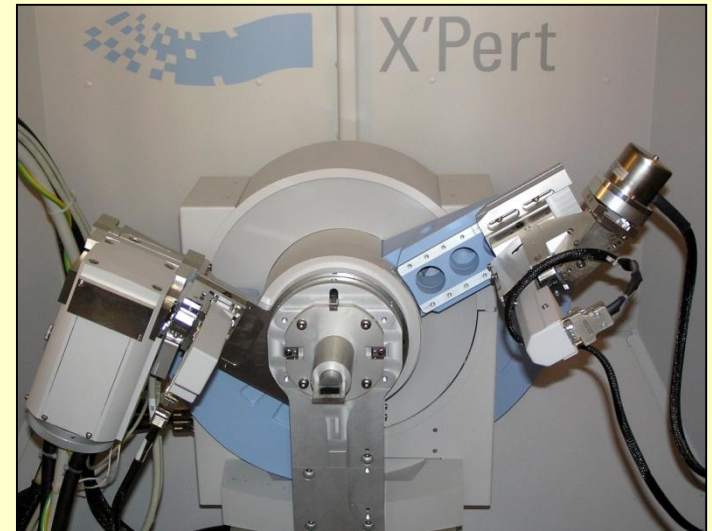
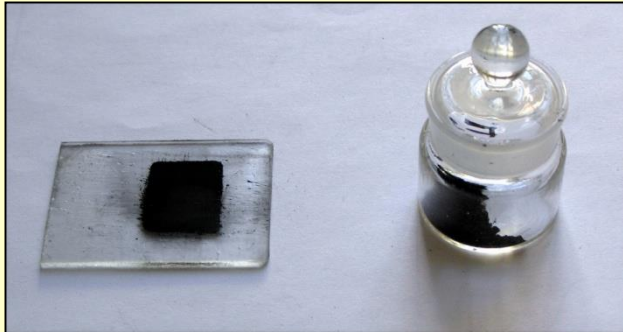


Převzato od Fiala, Kolega: Mat. Struct. 18, 81 (2011).

- kvalitativní analýza:
 - referenční databáze PDF IV (asi 750 000 fází)
 - identifikační algoritmy a vyhledávací software
- kvantitativní analýza:
 - bezstandardové metody
 - standardové metody
 - teoretický RTG práškový difraktogram
 - Rietveldova metoda

Např. u fázové polymorfní směsi je RTG difrakční analýza nejdůležitější metodou identifikace a stanovení

RTG fázová (prášková) analýza - experiment



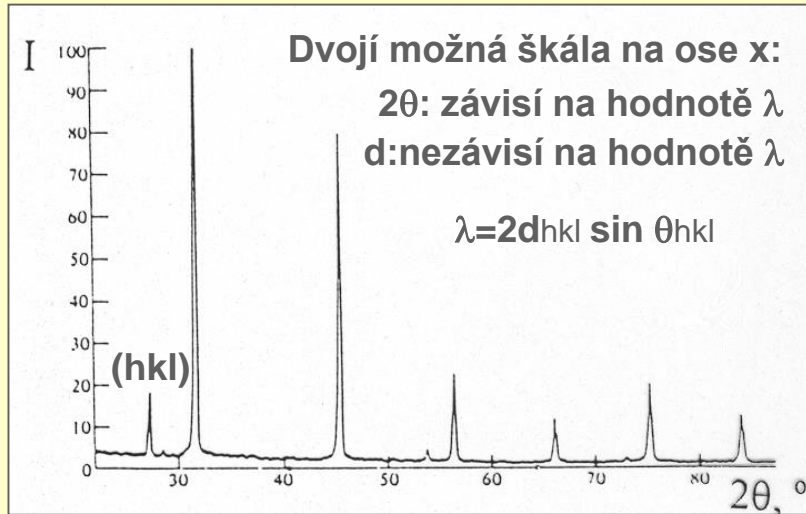
Vstupní materiál :

- prášek o zrnitosti 10^{-3} - 10^{-5} mm
- plíšek, plocha, vrstva , plíšek, kapilára...

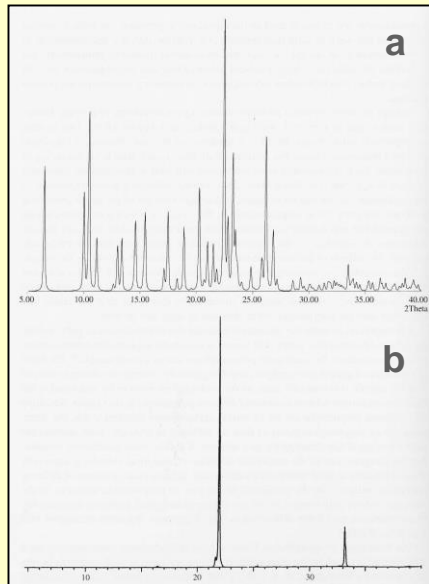
Přístrojová technika:

- práškový RTG difraktometr
- doba měření řádově min. až desítky min. (několik 10 - 100 reflexí z jedné dimenze)

RTG fázová (prášková) analýza - výsledek experimentu



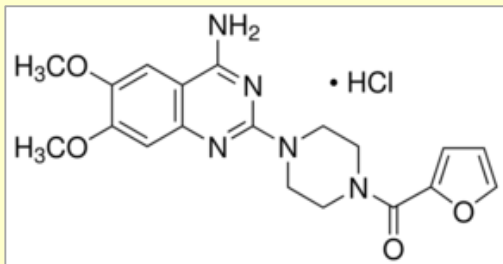
RTG práškový difraktogram (difrakční obraz),
na kterém lze odečíst:
polohy, intenzity, profily a šířky difrakčních linií



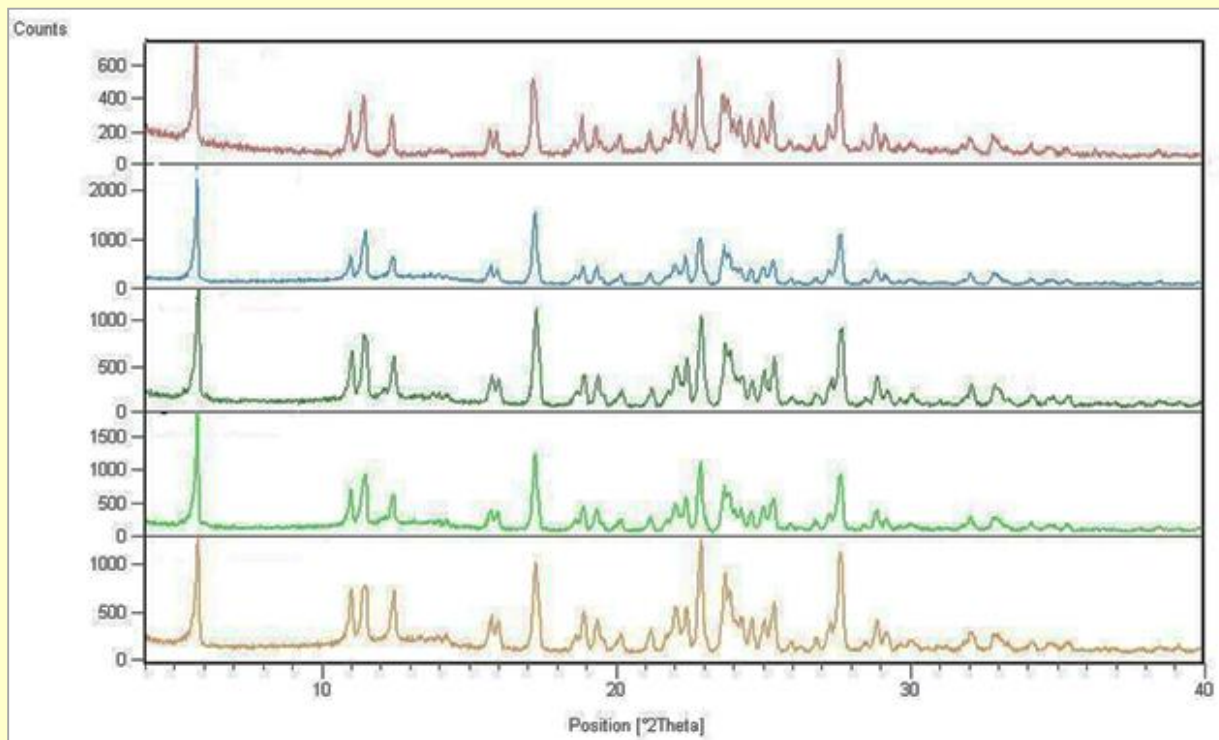
Zkreslení intenzit – přednostní orientace (textura) !
Analogie přednostního uspořádání šupinovitých
krystalitů ve vzorku podle preferenčního tvaru
K potlačení se používá kapilární technika !

Dva difraktogramy sulfathiazolu III (Bernstein, 2002):
S potlačením přednostní orientace (a),
bez potlačení přednostní orientace (b).

Monitorování fázové čistoty a reprodukovatelnosti výrobních šarží (QC) léčivých látek metodou RTG práškové difrakce

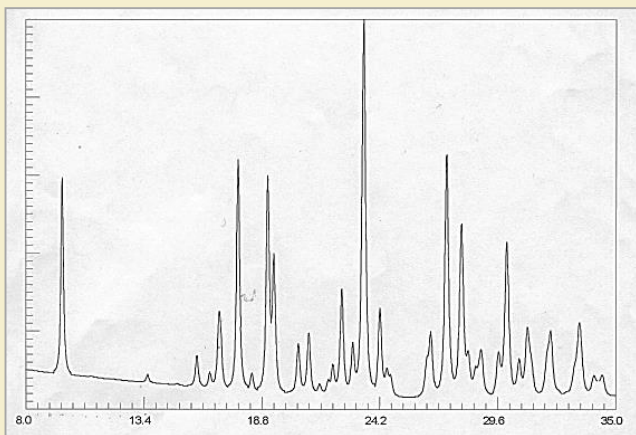


Prazosin hydrochlorid (antihypertensivum)

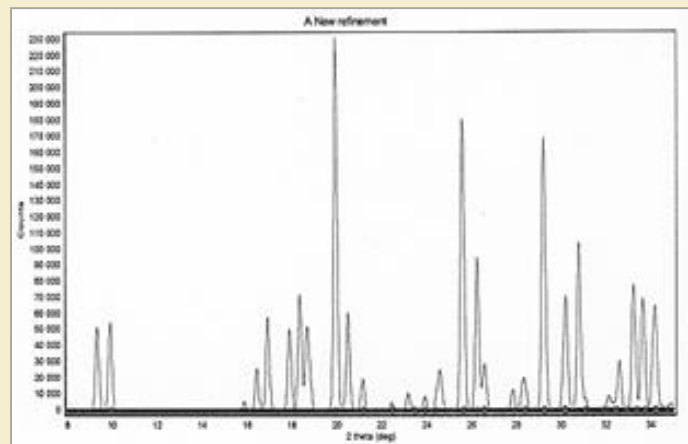


RTG práškové difraktogramy výrobních šarží prazosinu hydrochloridu

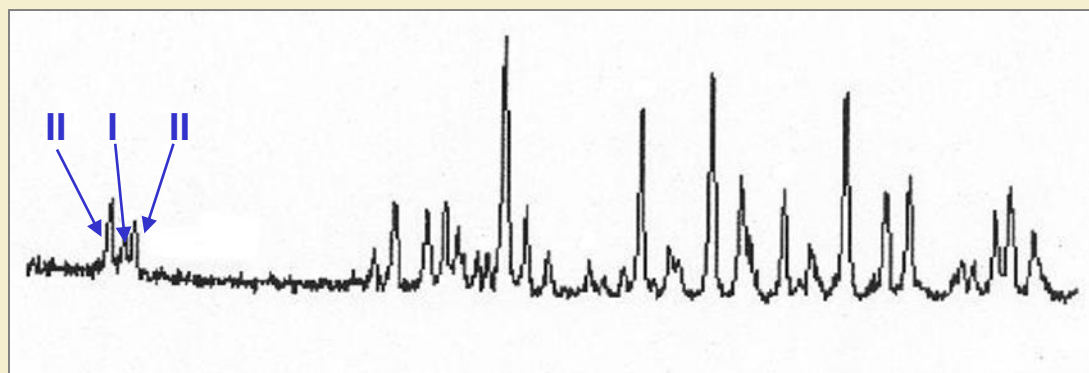
Detekce polymorfní nečistoty u raniditinu hydrochloridu metodou RTG práškové difrakce



RTG práškový difraktogram polymorfu I



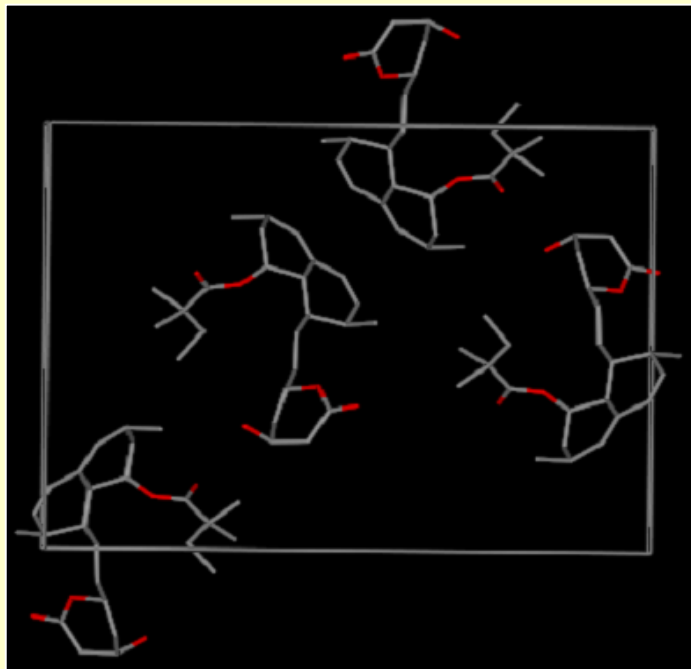
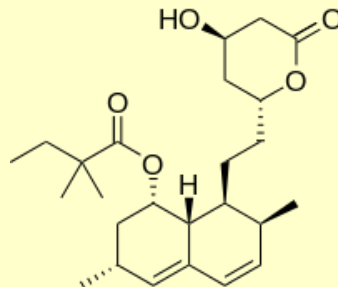
RTG práškový difraktogram polymorfu II



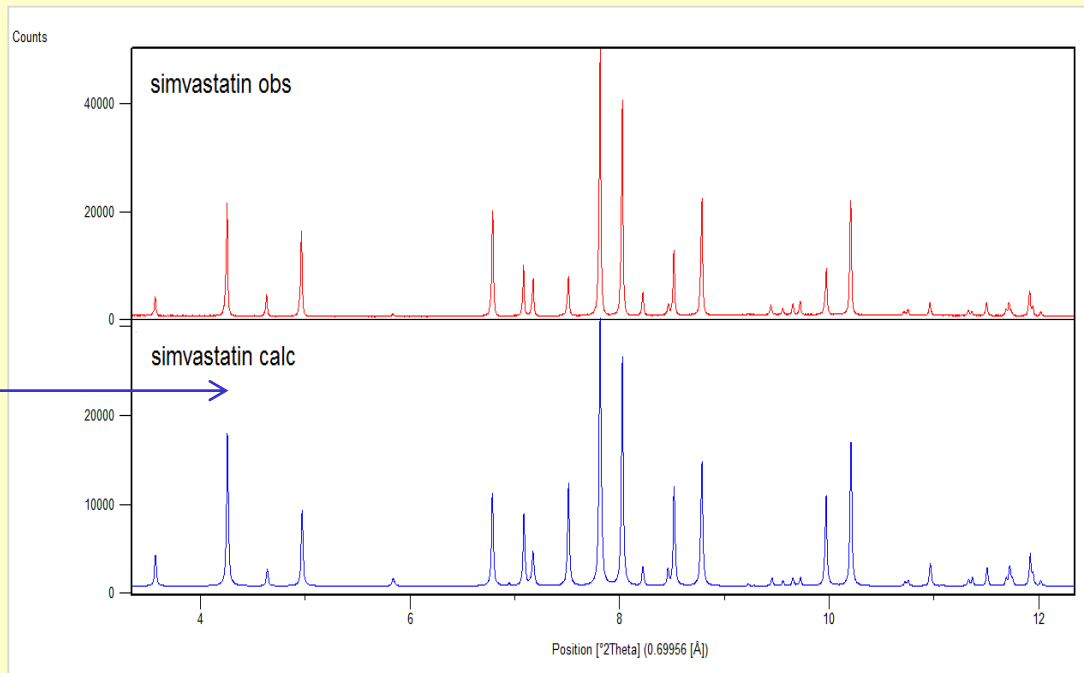
RTG práškový difraktogram směsi polymorfů I + II

Potvrzení strukturně-fázové čistoty výrobních šarží

simvastatin (hypolipidemikum)

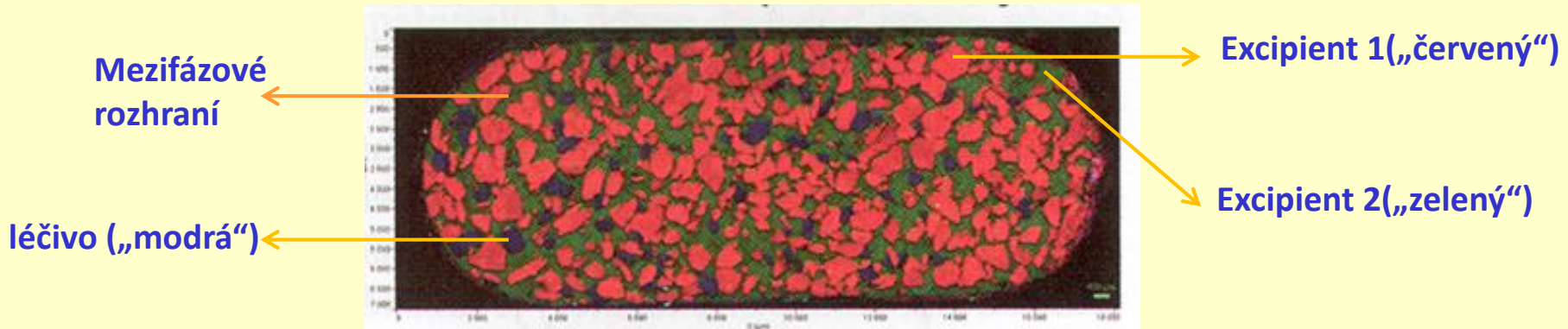


Krystalová struktura simvastatinu

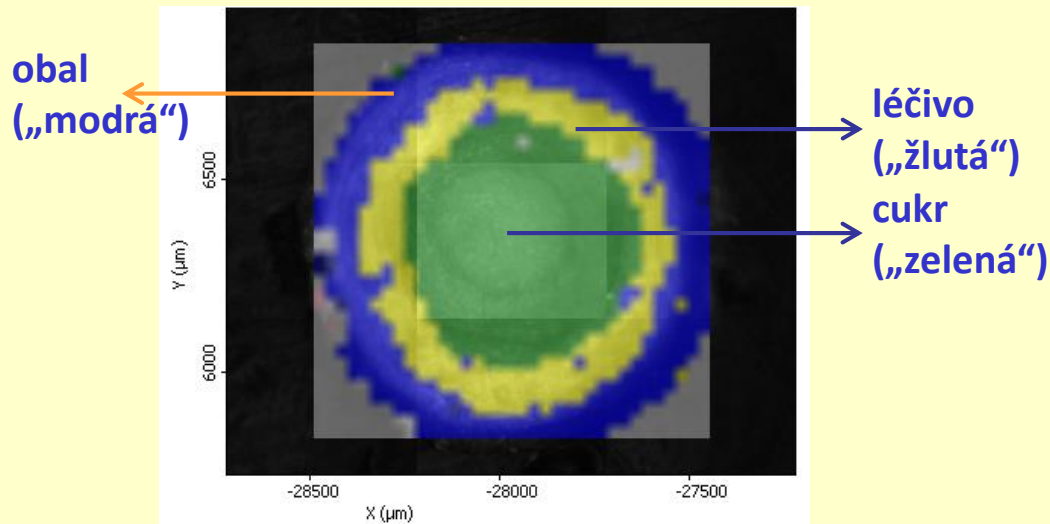


Naměřený (obs) a vypočtený (calc) RTG práškový difraktogram simvastatinu

Mikrostruktura pevných lékových forem – technika RTG mikrodifrakce



Mapping mikrostruktury tobolky (Ramanova spektroskopie)



Mapping mikrostruktury pelety (infračervená spektroskopie)



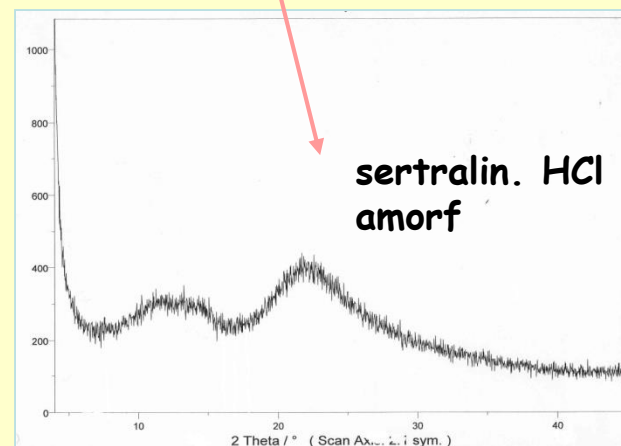
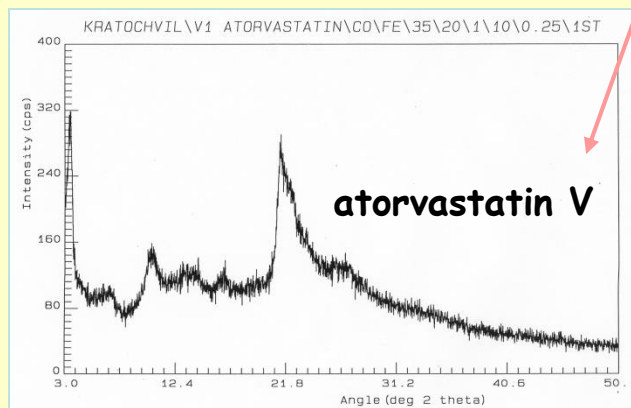
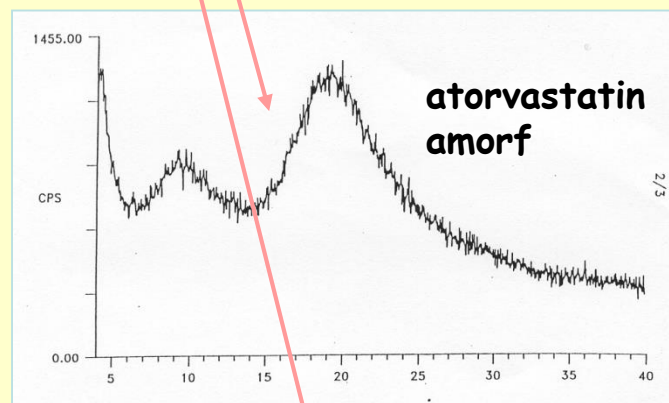
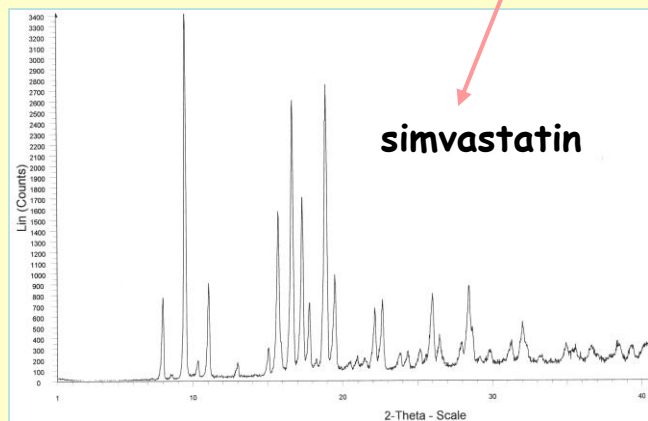
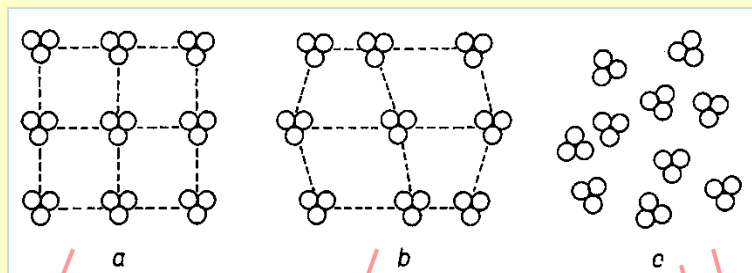
Identifikace nečistoty na tabletě

Difrakce na látkách krystalických, semikrystalických a amorfních

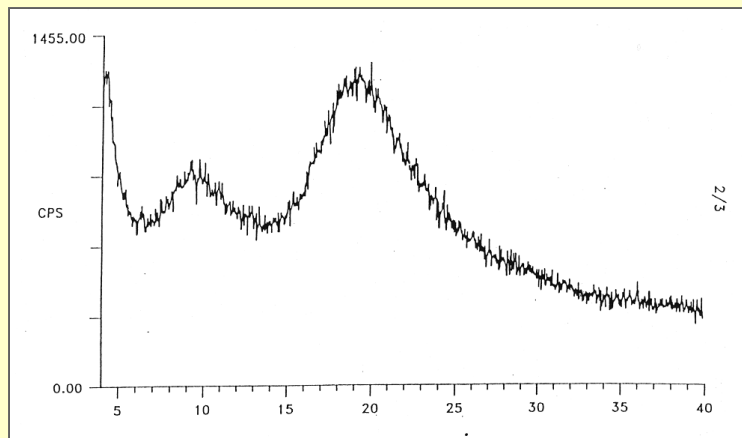
a

b

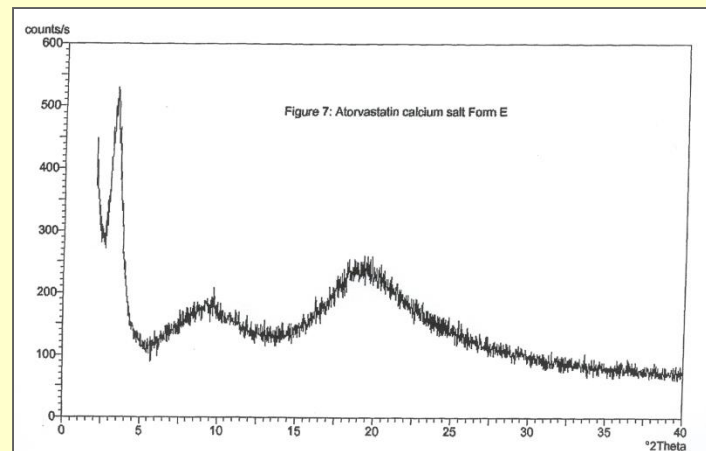
c



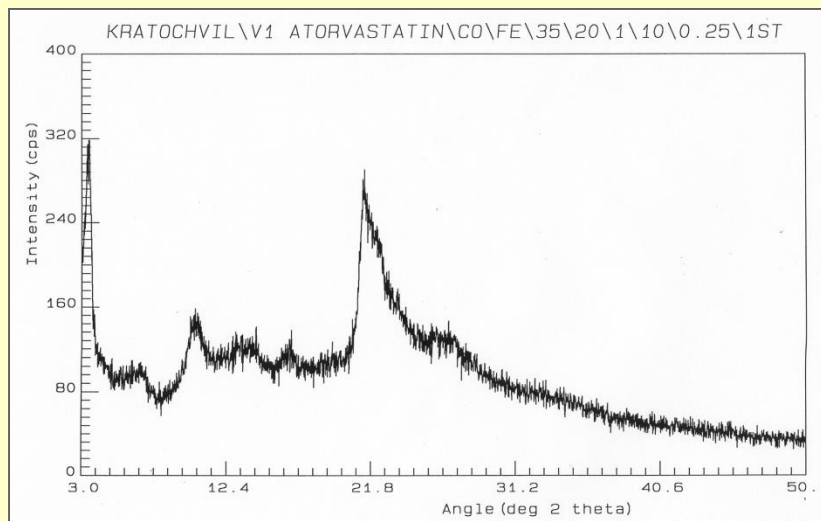
Patenty a vědecká pravda - semikrystalické fáze



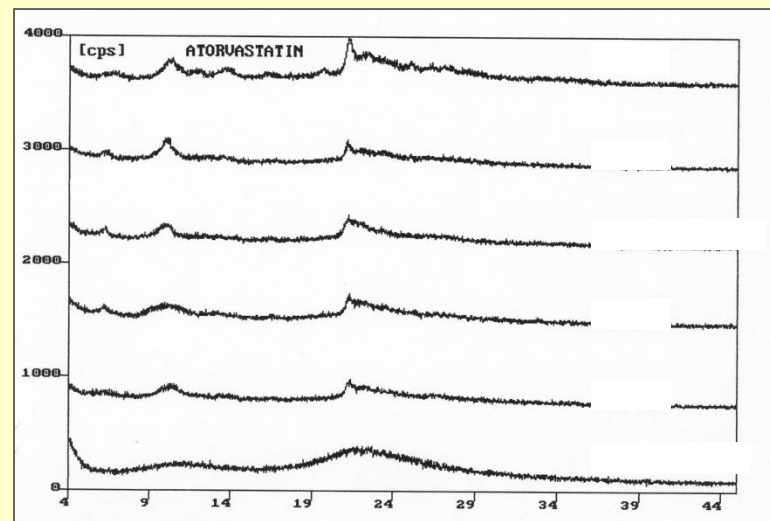
Difraktogram amorfního atorvastatinu
Patent firmy Warner-Lambert Co.



Difraktogram amorfního atorvastatinu (forma E)
Patent firmy Ciba Specialty Chemicals Holding Inc.



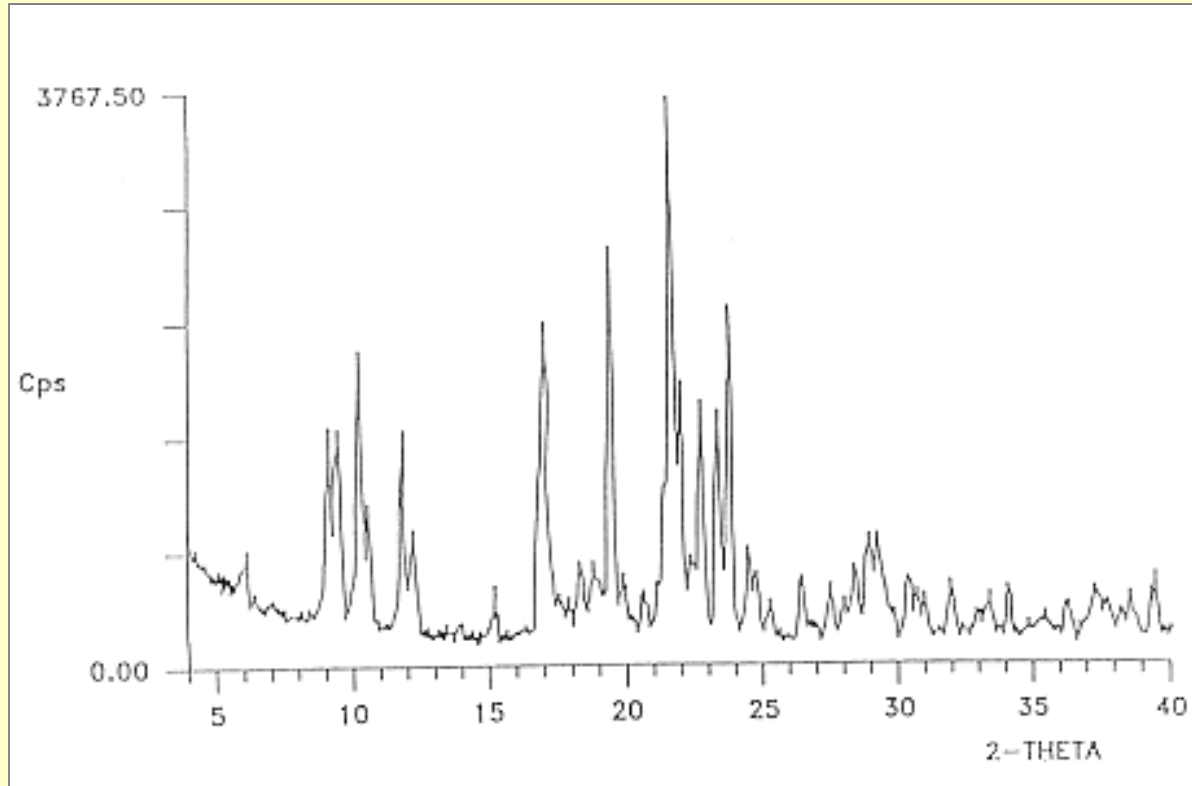
Difraktogram semikrystalické formy
atorvastatinu (V Teva)



Přechodové fáze atorvastatinu mezi
amorfni a semikrystalickou formou

Patenty a atorvastatin

(v současnosti zapatentováno asi 70 pevných forem atorvastatinu)



U atorvastatinu I připadá na škálu do 36° 2-theta 47 píků,
u 70 forem atorvastatinu $70 \times 47 = \approx 3200$ píků...
koincidence pozic píků vyvolají patentové spory !

Závěry

- RTG difrakční metodika je nejdůležitější analytickou technikou pro monitorování krystalických a v menší míře i amorfních fází ve farmacii
- RTG difrakce zahrnuje dvě hlavní analytické metodiky:
 - strukturní analýzu (z monokrystalu a z prášku)
 - fázovou analýzu (identifikaci a stanovení kryst. a amorfních fází)
- RTG difrakční metodika především monitoruje:
 - strukturně-fázovou čistotu výrobních šarží
 - polymorfismus
 - stabilitu, degradační produkty, meziprodukty
 - farmaceutické fáze (anhydráty, hydráty, solváty, soli, kokrystaly)
- Výsledky RTG difrakčních metodik jsou důležité ve vývoji, kontrole kvality výroby, reverzním inženýrství a v patentových sporech
- RTG difrakční metodika úzce kooperuje s ostatními pevnolátkovými metodami (především NMR, IČ, Raman, teplotní metody)
- Pro registrační autority je u pevných fází RTG difrakční metodika metodou první volby

Děkuji za

pozornost !