

Рентгеновская порошковая дифрактометрия. Практическое применение в экспертизе лекарственных средств

В.С. Кузьмин¹, В.В. Чернышев², В.А. Яшкир¹, В.А. Меркулов¹

¹Федеральное государственное бюджетное учреждение
«Научный центр экспертизы средств медицинского применения»
Министерства здравоохранения Российской Федерации, 127051, Москва, Россия

²Химический факультет Московского государственного
университета им. М.В. Ломоносова, 119991, Москва, Россия

Резюме: Метод рентгенофазового анализа основан на получении и последующем анализе дифракционной картины, возникающей в результате дифракции рентгеновских лучей, рассеянных электронами атомов облучаемого поликристаллического образца. С использованием этого метода в рамках предрегистрационной экспертизы проведено исследование фармацевтических субстанций темозоломида, формы I валацикловира гидрохлорида моногидрата и кветиапина фумарата (форма I) с целью подтверждения их подлинности. Полученные результаты позволили заключить, что представленная заявителем субстанция темозоломида не является первичной, а субстанция валацикловира не удовлетворяет заявленным требованиям по показателю «Подлинность».

Ключевые слова: рентгеновская порошковая дифрактометрия; рентгенофазовый анализ; субстанции лекарственных средств; показатель «Подлинность».

Библиографическое описание: Кузьмин В.С., Чернышев В.В., Яшкир В.А., Меркулов В.А. Рентгеновская порошковая дифрактометрия. Практическое применение в экспертизе лекарственных средств. Вестник Научного центра экспертизы средств медицинского применения 2015; (2): 13–16.

X-RAY POWDER DIFFRACTION. THE PRACTICAL APPLICATION OF THE METHOD IN THE PHARMACEUTICAL EXPERTISE

V.S. Kuzmin¹, V.V. Chernyshev², V.A. Yashkir¹, V.A. Merkulov¹

¹Federal State Budgetary Institution «Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal
Products» of the Ministry of Health of the Russian Federation, 127051, Moscow, Russia

²Department of Chemistry M.V. Lomonosov Moscow State University, 119991, Moscow, Russia

Abstract: Method of X-ray phase analysis based on obtaining and analyzing the diffraction pattern resulting from the diffraction of x-rays scattered by electrons of the atoms of the irradiated polycrystalline sample. Using this method in the framework of a pre-registration examination the study of pharmaceutical substances temozolomide, form I of valacyclovir hydrochloride monohydrate and quetiapine fumarate (form I) to confirm their authenticity. The results obtained allowed to conclude that the claimant substance temozolomide is not primary, and the substance of valacyclovir does not meet the stated requirements in terms of "Authenticity".

Key words: X-Ray powder diffraction; X-ray analysis; substances of medicines; index «Identity».

Bibliographic description: Kuzmin V.S., Chernyshev V.V., Yashkir V.A., Merkulov V.A. X-Ray powder diffraction. The practical application of the method in the pharmaceutical expertise. Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products Bulletin 2015; (2): 13–16.

При экспертизе лекарственных субстанций для подтверждения показателя «Подлинность» используют, среди прочих методов, рентгеновскую порошковую дифрактометрию (рентгенофазовый анализ или РФА).

Метод РФА основан на получении и последующем анализе дифракционной картины, возникающей в результате дифракции рентгеновских лучей, рассеянных электронами атомов облучаемого поликристаллического образца. Рентгеновские лучи — излучение, занимающее участок электромагнитного спектра от нескольких сотен до десятых долей ангстрема (А) ($1 \text{ А} = 0,1 \text{ нм}$). Расстояния между атомами в пространстве кристаллической решетки твердых тел варьируют от единиц до полутора десятков ангстрем, что и приводит к явлению дифракции.

Дифрагированный рентгеновский луч можно рассматривать как результат отражения от одной из плоскостей атомной решетки. Решетка представляет собой совокупность бесконечного числа параллельных атомных плоскостей, расположенных на равном расстоянии друг от друга. Отражение лучей будет происходить

от всех атомных плоскостей (их серий), так как рентгеновский луч, в отличие от оптического излучения, проникает вглубь кристалла.

Дифракционная картина — рентгенограмма вещества, которую можно получить при облучении кристалла монохроматическим рентгеновским излучением с длиной волны λ .

Для определения кристаллической структуры вещества необходимо знать параметры элементарной ячейки кристаллической решетки, координаты атомов, заполняющих ячейку и закон симметрии, которому подчиняется это расположение.

Все исследованные к настоящему времени кристаллические структуры органических веществ собраны в Кембриджской базе структурных данных, CSD [1].

Известно, что большинство твердых тел являются поликристаллическими, то есть состоят из большого числа хаотически расположенных кристаллов. Кристаллы, из которых состоит образец, очень малы, и в исследуемом объеме их оказываются десятки миллионов. Следовательно, всегда имеются их любые ориентировки

по отношению к рентгеновскому лучу, в том числе и те, которые удовлетворяют закону Вульфа — Брэгга, устанавливающему зависимость между длиной волны рентгеновских лучей λ , межплоскостными расстояниями (d) и углом отражения пучка рентгеновских лучей (θ) по отношению к отражающей плоскости: $2d \sin \theta = n\lambda$. В результате интерференции из отраженных разными микроструктурами лучей образуется дифракционная картина, состоящая из дифракционных максимумов различной интенсивности, фиксируемая детектором рентгеновских лучей. Интенсивность отдельного максимума зарегистрированного луча зависит от количества и сортов атомов, составляющих данное семейство плоскостей, то есть, от «заселенности» атомной плоскости.

Рассчитав полученную рентгенограмму, получают сведения о межплоскостных расстояниях в кристалле. Значение межплоскостных расстояний для каждого вещества строго индивидуально, поэтому рентгенограмма однозначно характеризует исследуемое вещество.

В результате дифракционная картина является своеобразным «паспортом» химического соединения, по которому можно установить, какому из уже известных ранее соединений соответствует полученная рентгенограмма.

Метод дифракции рентгеновских лучей на порошковом образце является инструментом для исследования поликристаллических субстанций лекарственных веществ.

Типичным применением метода рентгеновской порошковой дифрактометрии является определение подлинности фармацевтических субстанций лекарственных препаратов, полученных в виде кристаллических порошков, а также проверка наличия полиморфных модификаций и оценка степени кристалличности отдельных партий субстанций.

Порошкограммы всех твердофазных (порошок, таблетка, гранула) лекарственных субстанций собраны в порошковой базе PDF (Powder Diffraction File) международного центра дифракционных данных [2].

К достоинствам РФА относятся:

- достоверность и быстрота метода;
- метод — прямой, так как не основан на косвенном сравнении с эталонами, дает информацию о кристаллической структуре вещества — объективную характеристику каждой фазы;
- не требуется большого количества вещества (не более 100 мг);
- метод допускает оценку количества кристаллических фаз в смеси.

В обзорной статье [3] приведена информация о возможностях применения рентгеновской дифракции для целей фармацевтической промышленности.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

В качестве типичных примеров применения рентгеновской порошковой дифракции для подтверждения подлинности субстанций лекарственных средств выполнено исследование в рамках предрегистрационной экспертизы фармацевтических субстанций темозоломида, формы I валацикловира гидрохлорид моногидрат и кветиапина фумарата (форма I).

Измерения выполнены на порошковом дифрактометре Empyrean (новое поколение дифрактометров серии Xpert) фирмы PANalytical, медное излучение CuK_{α} ,

Ni-фильтр, длина волны излучения — 1.5406 и 1.54433 Å (2:1), линейный детектор X'celerator с диапазоном измерений 2.12° , съемка на отражение (геометрия Брэгга-Брентано) в области углов $3 - 40^\circ$ [2].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Темозоломид. Для проверки подлинности субстанции темозоломида получены дифрактограммы стандартного образца (А) и образца субстанции (В). Порошкограммы образцов А и В совпадают практически полностью (см. рис. 1, 2 и 3), и в этом смысле они идентичны.

Необходимо заметить, что обе порошкограммы содержат слабый пик при угле 11.20° , который не описывается известной полиморфной модификацией темозоломида в пр. гр. $P2_1/c$ [4].

На всех рисунках: по оси X отложены значения углов 2θ (град), по оси Y значения интенсивностей пиков (импульс).

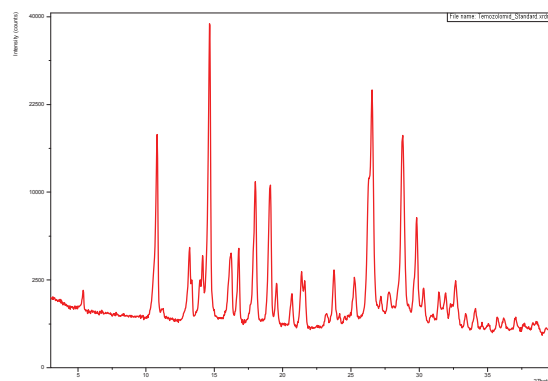


Рис. 1. Порошкограмма стандартного образца А темозоломида

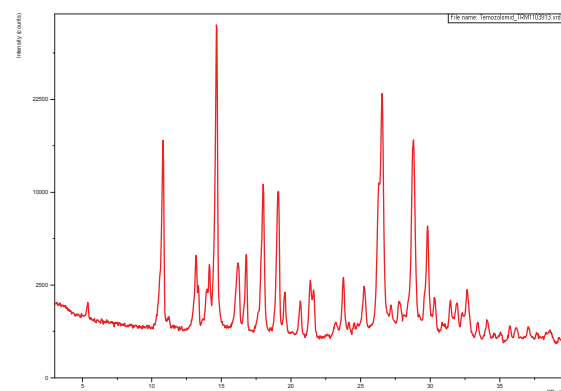


Рис. 2. Порошкограмма образца субстанции В темозоломида

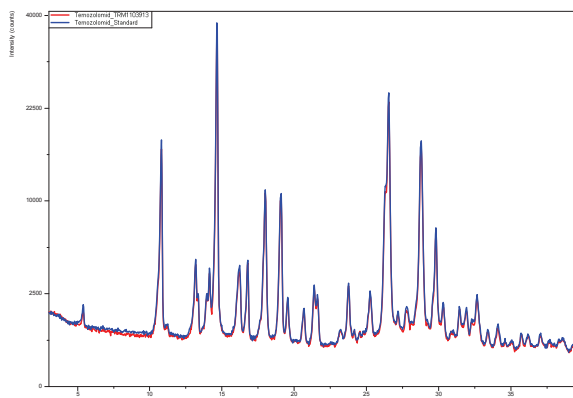


Рис. 3. Совместное представление порошкограмм образцов А (синяя кривая) и В (красная) темозоломида

Также этот пик не описывается другими известными полиморфными модификациями темозоломида — моноклинная, пр. гр. $P2_1/n$, и триклинная, $P-1$.

Таким образом, остается открытым вопрос, наличием какой субстанции в двух представленных образцах (**A** и **B**) можно объяснить появление слабого дифракционного пика при угле 11.20° .

Возникают сомнения в природе представленного стандарта **A**. По-видимому, представленный производителем стандартный образец темозоломида не является первичным.

Валацикловира гидрохлорид моногидрат. Порошкограмма стандартного образца **A** (Рис. 4) содержит значимые (т.е. относительной интенсивности $>5\%$) пики при углах — $3.65, 8.57, 9.46, 10.81, 12.13, 13.33, 14.55, 16.45$ и др. Таким образом, образец **A** соответствует форме I субстанции валацикловира гидрохлорид моногидрат.

Кристаллическая форма I субстанции валацикловира гидрохлорид моногидрат описана (в частности) в патенте **EP1746098A1**. Кристаллическая форма субстанции безводного валацикловира гидрохлорид (форма II) моногидрат описана (в частности) в патенте **US2006229322A1**. На порошкограмме она имеет характерные дифракционные пики при углах — $6.76, 9.36, 11.54, 13.98, 15.45, 15.75, 17.12$ и др.

Порошкограмма субстанции образца **B** (Рис. 5), помимо значимых пиков формы I, содержит также значимые пики при углах — $6.72, 9.33, 11.50, 13.94, 15.45, 15.74, 17.11$ и др. Таким образом, образец **B** содержит две кристаллические фазы — форму I субстанции валацикловира гидрохлорид моногидрат и безводный валацикловира гидрохлорид (форму II). Соотношение этих фаз в образце **B** можно грубо оценить как 1:1. На рис. 6 представлено наложение дифрактограмм **A** и **B**.

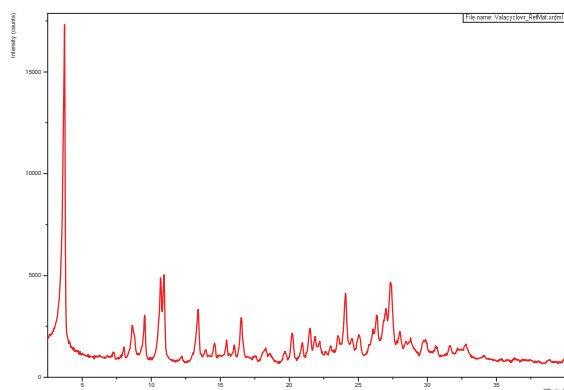


Рис. 4. Порошкограмма образца **A** валацикловира

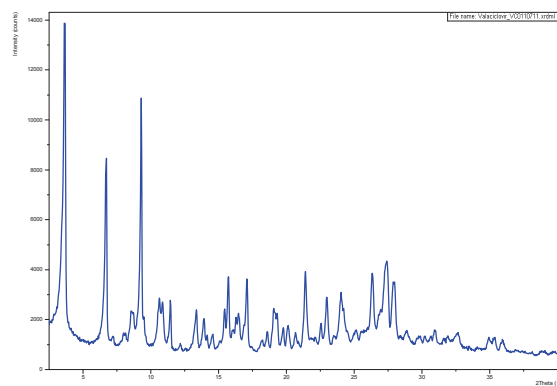


Рис. 5. Порошкограмма образца субстанции **B** валацикловира

Следовательно, представленная субстанция не удовлетворяет заявленным требованиям по показателю «Подлинность».

Кветиапина фумарат. Дифрактограмма испытуемой субстанции кветиапина фумарат (**B**) соответствует дифрактограмме стандартного образца (**A**) (форма I): пики на дифрактограммах присутствуют при значениях углов 2θ , равных $9,1; 11,6; 15,2; 15,8; 16,2; 17,6; 19,6; 19,9; 20,1; 21,0; 22,2; 23,3$ и $25,0 \pm 0,2^\circ$.

Из анализа полученных дифрактограмм следует, что образцы **A** и **B** однофазны и содержат только кристаллическую форму I субстанции кветиапина фумарат (см. рис. 7, 8 и 9), и в этом смысле они идентичны. Кристаллическая структура формы I субстанции кветиапина фумарат установлена ранее [5], что позволяет однозначно установить однофазность образцов стандартного и субстанции, используя уточнение методом Ритвельда (рис. 10).

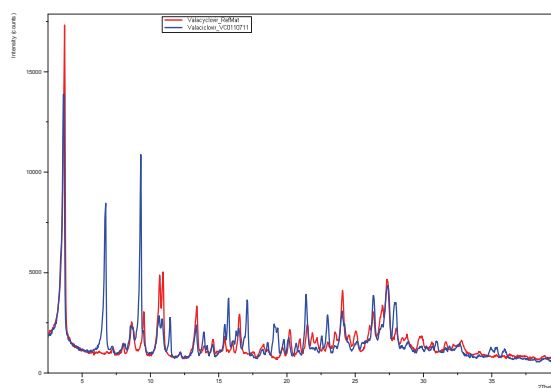


Рис. 6. Совместное представление порошкограмм образцов **A** (красная кривая) и **B** (синяя) валацикловира

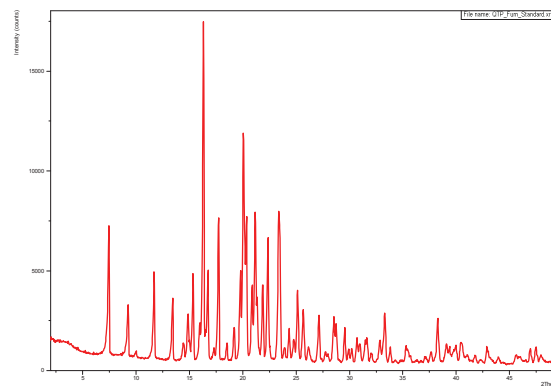


Рис. 7. Порошкограмма стандартного образца **A** кветиапина фумарат

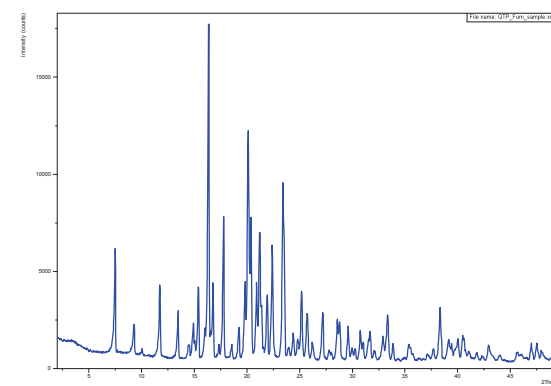


Рис. 8. Порошкограмма образца субстанции **B** кветиапина фумарат

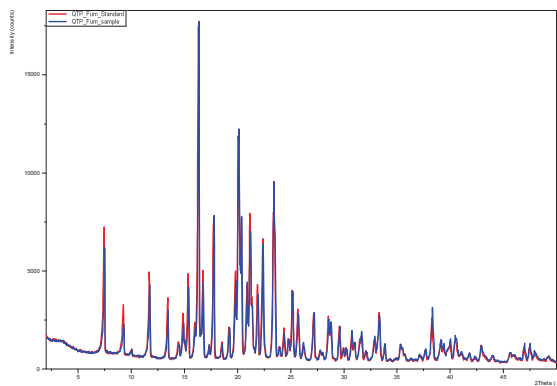


Рис. 9. Совместное представление порошковых диаграмм образцов А (красная кривая) и В (синяя)

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Приведенные примеры убедительно показывают возможность и целесообразность применения рентгеновской порошковой дифрактометрии при установлении подлинности фармацевтических субстанций лекарственных препаратов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Groom CR, Allen FH. Cambridge Structural Database. Angew Chem Int Ed. 2014; 53: 662–71. Available from: <http://www.ccdc.cam.ac.uk/products/csd/>.
2. ICDD (2000). The Powder Diffraction Database. International Centre for Diffraction Data, Newtown Square, Pennsylvania, USA. Available from: <http://www.icdd.com/products/pdf2.htm>.
3. Чернышев ВВ. Рентгеновская дифракция. Что она может дать фармацевтической промышленности? Фармацевтическая промышленность 2011; (3): 76–80.
4. Lowe PR, Sansom CE, Schwalbe CH, Stevens MFG, Clark AS. Antitumor imidazotetrazines. J Med Chem. 1992; 35: 3377–82.
5. Acta Crystallographica. Section E Structure Reports Online. ISSN 1600–5368.

ОБ АВТОРАХ:

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Министерства здравоохранения Российской Федерации. 127051, Москва, Петровский бульвар, 8.
Кузьмин Владимир Семенович. Ведущий эксперт лаборатории нанолекарств, препаратов для клеточной и генотерапии, д-р хим. наук.
Яшкир Вадим Анатольевич. Начальник лаборатории нанолекарств, препаратов для клеточной и генотерапии, канд. хим. наук.
Меркулов Вадим Анатольевич. Первый заместитель генерального директора, д-р мед. наук, профессор.

Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, химический факультет. 119991, Москва, Ленинские Горы, д. 1 стр. 3.
Чернышев Владимир Васильевич. Ведущий научный сотрудник, д-р хим. наук.

АДРЕС ДЛЯ ПЕРЕПИСКИ:

Яшкир Вадим Анатольевич; Yashkir@expmc.ru

Статья поступила 20.05.2015 г.

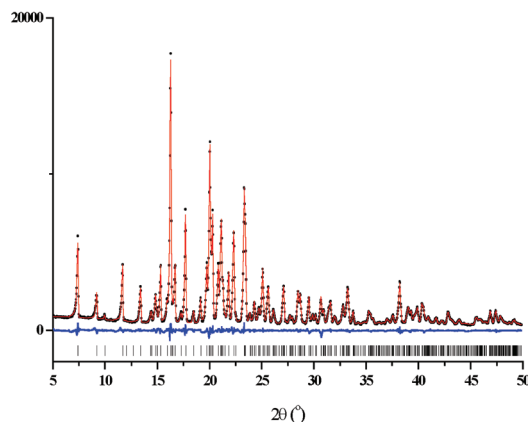


Рис. 10. Результат уточнения порошковой диаграммы образца субстанции кветиапина фумарат В в предположении, что ее структура соответствует форме I. Точки — обозначают экспериментальные значения, красная кривая — вычисленные значения, синяя — разность между экспериментальными и вычисленными значениями. Вертикальные отрезки показывают расчетные положения пиков. Полное совпадение, стандарт в таком случае не нужен.

REFERENCES

1. Groom CR, Allen FH. Cambridge Structural Database. Angew Chem Int Ed. 2014; 53: 662–71. Available from: <http://www.ccdc.cam.ac.uk/products/csd/>.
2. ICDD (2000). The Powder Diffraction Database. International Centre for Diffraction Data, Newtown Square, Pennsylvania, USA. Available from: <http://www.icdd.com/products/pdf2.htm>.
3. Chernyshev VV. X-Ray diffraction. What can it give to the pharmaceutical industry? Farmatsevticheskaya promyshlennost 2011; (3): 76–80 (in Russian).
4. Lowe PR, Sansom CE, Schwalbe CH, Stevens MFG, Clark AS. Antitumor imidazotetrazines. J Med Chem. 1992; 35: 3377–82.
5. Acta Crystallographica. Section E Structure Reports Online. ISSN 1600–5368.

AUTHORS:

Federal State Budgetary Institution «Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products» of the Ministry of Health of the Russian Federation, 8 Petrovsky Boulevard, Moscow, 127051, Russian Federation.

Kuzmin VS. Leading expert of Laboratory of nanomedicines, medicines for cell therapy and genotherapy. Doctor of Chemical Sciences.

Yashkir VA. Head of Laboratory of nanomedicines, medicines for cell therapy and genotherapy. Candidate of Chemical Sciences.

Merkulov VA. First Deputy Director General. Doctor of Medical Sciences, professor.

M.V. Lomonosov Moscow State University, Department of Chemistry, 1/3 Leninskie Gory, Moscow, 119991, Russian Federation.

Chernyshev VV. Leading researcher. Doctor of Chemical Sciences.

Принята к печати 25.05.2015 г.