

Analiza śladowa i instrumentalna

CHC 0164 1

Ćwiczenie 7: Analiza preparatów farmaceutycznych

Cel: ćwiczenie ma na celu przeprowadzenie analizy fazowej wybranych preparatów farmaceutycznych z zastosowaniem proszkowej dyfrakcji rentgenowskiej; analiza fazowa polega na identyfikacji składu chemicznego leków możliwej dzięki interpretacji dyfraktogramów cyfrowych uzyskanych przy użyciu dyfraktometru rentgenowskiego X'PERT firmy Philips

Według polskiego ustawodawstwa¹ produktem leczniczym „*jest substancja lub mieszanina substancji, przedstawiana jako posiadająca właściwości zapobiegania lub leczenia chorób występujących u ludzi i zwierząt lub podawana w celu postawienia diagnozy lub w celu przywrócenia, poprawienia lub modyfikacji fizjologicznych funkcji organizmu poprzez działanie farmakologiczne, immunologiczne lub metaboliczne*”. Leki dostępne w Polsce ujęte są w Rejestrze Produktów Leczniczych Dopuszczonych do Obrotu na terytorium Rzeczypospolitej Polskiej, prowadzonym przez Urząd Rejestracji Produktów Leczniczych, Wyrobów Medycznych i Produktów Biobójczych.

Skuteczność preparatu farmaceutycznego w leczeniu danej choroby zależy od bardzo wielu czynników. Najważniejszymi z nich są: budowa chemiczna i zastosowana dawka. Stosowane w lecznictwie środki są mniej lub bardziej skomplikowane pod względem składu lub budowy chemicznej. Spotykamy wśród nich zarówno pojedyncze pierwiastki, proste związki nieorganiczne, jak i skomplikowane połączenia organiczne, złożone układy fizykochemiczne lub subtelne zespoły biochemiczne.

Zakres badań chemicznych, na podstawie których oceniana jest jakość i przydatność substancji stosowanych w farmakoterapii obejmuje:

- ⇒ potwierdzanie tożsamości związku lub jego identyfikację, substancje pomocnicze
 - ⇒ badanie czystości: zanieczyszczenia dyskwalifikujące badany lek mogą pochodzić z produkcji (zanieczyszczony substrat, rozpuszczalniki) i wtedy określane są jako zanieczyszczenia niespecyficzne; mogą też powstawać jako produkty uboczne podczas reakcji syntezy substancji biologicznie czynnej lub jako produkty rozkładu substancji leczniczej na skutek niewłaściwego przechowywania i wpływu rozmaitych czynników przyspieszających ten rozkład (światło, wilgoć, temperatura) - ten typ zanieczyszczeń określa się jako specyficzne
 - ⇒ określanie zawartości substancji czynnej w badanym preparacie.
- Ponad to w przypadku preparatów farmaceutycznych prowadzone są badania mające na celu:
- ⇒ analizę jakościową substancji aktywnych w dostępnych na rynku lekach prostych i złożonych,
 - ⇒ określenie wpływu zmian strukturalnych leków na ich stabilność chemiczną i podatność na metabolizm,
 - ⇒ sprawdzenie czystości syntezowanych substancji biologicznie aktywnych wraz z analizą wpływu przeprowadzonych procedur laboratoryjnych na czystość i wydajność syntezy otrzymanych związków
 - ⇒ oszacowanie zależności pomiędzy strukturą chemiczną a działaniem farmakologicznym oraz wartością terapeutyczną leków.

Dyfrakcja to zjawisko rozpraszania i interferencji promieniowania. Według teorii Lauego, każdy z atomów sieci krystalicznej staje się źródłem fal sferycznych o takiej samej częstotliwości drgań, jak padające na niego promienie rentgenowskie. Teoria dyfrakcji promieniowania według Braggów i Wulfa mówi, że kierunki wzmocnionych promieni rentgenowskich to kierunki selektywnego interferencyjnego odbicia od określonych płaszczyzn sieciowych kryształu.

¹ Prawo farmaceutyczne, Dz. U. z 2001 r. Nr 126, poz. 1381

Proszkowa dyfrakcja rentgenowska (*ang.* X-ray diffraction, XRD) stosowana jest do analizy substancji krystalicznych i polikrystalicznych, a także do określania składu fazowego i struktur występujących w badanych próbkach stałych. Dyfrakcja rentgenowska jest podstawową metodą analizy strukturalnej i defektowej materiałów krystalicznych. Z zastosowaniem tej metody badane są m.in. farmaceutyki, stopy metali, numizmaty, materiały geologiczne i budowlane, popioły. Metoda może być również zastosowana do opisu odmian amorficznych. Ponadto proszkowa dyfrakcja rentgenowska stosowana jest do wyznaczania parametrów komórki jednostkowej i grupy przestrzennej oraz struktury cząsteczkowej.

W dyfraktometrii proszkowej mamy do czynienia z badaniami materiałów polikrystalicznych składających się z wielkiej liczby drobnych, przypadkowo zorientowanych kryształów. Odnosi się to zarówno do sproszkowanych substancji, jak też do typowych materiałów polikrystalicznych, takich jak stal czy ceramika.

Dane dyfrakcyjne są otrzymywane w postaci dyfraktogramów przedstawiających zależność intensywności refleksów dyfrakcyjnych od odległości międzypłaszczyznowej d lub kąta odbicia braggowskiego 2θ . Dyfraktogram jest właściwy dla każdej struktury i stanowi charakterystyczny i niepowtarzalny obraz dyfrakcyjny danej substancji o określonym upakowaniu. Obraz dyfrakcyjny pozostaje taki sam zarówno dla substancji w stanie czystym jak również w przypadku jej występowania w mieszaninie. Dzięki temu możliwa jest analiza składu danej próbki z możliwością określenia rodzaju fazy w jakiej występuje dana substancja.

Proszkowa dyfrakcja rentgenowska znalazła zastosowanie w:

- i) analizie fazowej i strukturalnej materiałów polikrystalicznych,
- ii) analizie strukturalnej monokryształów,
- iii) analizie defektów w monokryształach i cienkich warstwach.

Zastosowanie tej techniki pozwala również na:

- ⇒ jakościowa i ilościowa krystalograficzna (badanie fazowe),
- ⇒ określenie struktury krystalicznej w tym wskaźnikowanie, a także określenie parametrów sieci krystalicznej,
- ⇒ wyznaczanie wymiarów kryształitu (rozmiarów ziaren),
- ⇒ oszacowanie stopnia krystalizacji materiału,
- ⇒ badanie mikronaprężeń,
- ⇒ analiza cienkich warstw – preferowana orientacja,
- ⇒ badania tekstury.

PRZYGOTOWANIE PRÓBEK:

- ⇒ kilka tabletek lub niewielką ilość badanego preparatu farmaceutycznego należy rozetrzeć w moździerzu agatowym lub ceramicznym na drobnoziarnisty proszek;
- ⇒ przygotowaną próbkę umieścić w kuwecie pomiarowej modelując przy pomocy szpatułki możliwie gładką powierzchnię - próbka powinna utrzymywać się w kuwecie po ustawieniu tejże do pozycji pionowej;
- ⇒ umieścić naczynko pomiarowe w uchwycie goniometru dyfraktometru;
- ⇒ przeprowadzić rejestrację widma korzystając ze szczegółowej instrukcji zamieszczonej poniżej.

INSTRUKCJA OBSŁUGI APARATU PHILIPS

Uruchamianie aparatu:

1. włączyć zasilanie główne (na ścianie, z tyłu aparatu),
2. odkręcić wodę chłodzącą lampę rentgenowską (niebieska dźwignia zaworu powinna zostać przekręcona o około 45°, tak aby na na przednim panelu aparatu nie pojawiał się komunikat o niedostatecznym przepływie wody – czerwona dioda „no waterfolw” z przodu urządzenia powinna zgasnąć),
3. włączyć czarny przycisk (ON), znajdujący się z tyłu aparatu, na dole (przycisk podczas pracy aparatu świeci się na czerwono),
4. przekręcić kluczyk w aparacie do pozycji poziomej,
5. wcisnąć w krótkim odstępie czasu przyciski: POWER-ON i HT-ON,
6. ustalić wartość napięcia do 40kV (powoli, stopniowo przekręcać pokrętło, zwracając uwagę na to, aby nie było skoków natężenia),
7. ustalić wartość natężenia do 30mA,
8. w celu uruchomienia pomiaru należy jednocześnie wcisnąć przycisk SHUTTERS i OPEN (SHUTTER 4).

Wyłączanie aparatu:

1. po zakończeniu pomiaru zamykamy okienko naciskając przycisk CLOSE (SHUTTER 4), a następnie biały przycisk z tyłu aparatu, znajdujący się pod gniazdem X179 – co pozwoli na prównt gniazda pomiarowego do położenia początkowego,
2. całkowitego wyłączenia aparatu dokonujemy w kolejności odwrotnej niż w przypadku uruchamiania, czyli:
 - ⇒ zmniejszyć natężenie do wartości 10mA,
 - ⇒ zmniejszyć napięcie do wartości 10kV,
 - ⇒ wyłączyć zasilanie, czyli przyciski HT-OFF i POWER-OFF,
 - ⇒ wyłączyć czarny przycisk (OFF) z tyłu aparatu,
 - ⇒ zamknąć dopływ wody,
 - ⇒ wyłączyć zasilanie na ścianie.

INSTRUKCJA OBSŁUGI PROGRAMU DO REJESTRACJI WIDM

1. po uruchomieniu komputera, uruchamiamy program PHILPEK znajdujący się na dysku D,
2. w menu głównym programu wchodzimy w zakładkę **measurement** i wybieramy komendę: new,
3. następnie wpisujemy tytuł/nazwę badanej próbki i akceptujemy ją wybierając Enter,
4. z rozwiniętej lity wybieramy plik z wymaganymi parametrami pomiaru, w szczególności: zakres pomiarowy kąta 2Theta, krok, czyli kąt, o który zmienia się położenie goniometru, czas zliczania pojedynczego impulsu (najczęściej stosowane parametry są zapisane w pliku: pomiar1 – w tabeli 1 zamieszczonej na końcu instrukcji przedstawiono typowe warunki przebiegu eksperymentu);
5. wybieramy komendę **Run** (Enter),
6. w zakładce File wybieramy komendę: Save as i wpisujemy nazwę, pod którą mają być zachowane dane pomiarowe,
7. po zakończeniu rejestracji widma wychodzimy z menu wybierając komendę: Exit, w zakładce File,
8. zamykając okno dialogowe kończymy pracę programu Philipek, wyłączamy komputer.

INSTRUKCJA OBSŁUGI PROGRAMU DO ANALIZY WIDM „DHN-PDS”

1. program służący do opracowywania danych pomiarowych znajduje się na dysku D, D:/Dhn_pds,
2. w celu uruchomienia programu należy otworzyć plik M.bat,
3. następnie, kolejno wybieramy komendy z menu głównego:
 - 3.1. Translation
 - 3.2. Utilities
 - 3.3. New File – tutaj należy podać nazwę pliku, w którym zapisane są dane pomiarowe, które chcemy opracowywać – plik z rozszerzeniem 01 lub tym, które nazwa próbki faktycznie posiada, np. LEK1.01 lub LEK1.DRN; można, po wciśnięciu klawisza Enter wybrać żądany plik z listy),
4. w dalszej kolejności wybieramy komendy:
 - 4.1. Import
 - 4.2. DROnew (zamiast rozszerzenia DAN należy wpisać 01 lub inne, to z którym plik został faktycznie zapisany)
 - 4.3. Enter (powstaje nowy plik, z tą samą nazwą i rozszerzeniem RAW)
 - 4.4. Przechodzimy do głównego menu przez Utilities, Exit
5. uruchamiamy kolejno²:
 - 5.1. Data process
 - 5.2. Utilities
 - 5.3. New File (należy wpisać nazwę pliku z rozszerzeniem RAW lub po wciśnięciu klawisza Enter wybrać plik z listy)
 - 5.4. Strip (odejmowanie składowej związanej z linią $K\alpha_2$ promieniowania charakterystycznego lampy rentgenowskiej)
 - 5.5. Rachinger (należy wpisać nazwę pliku z rozszerzeniem RAW lub po wciśnięciu klawisza Enter wybrać plik z listy)
 - 5.6. Enter (powstaje plik z rozszerzeniem PUR - oczyszczony dyfraktogram jest zapisywany w pamięci, jako nowy dokument posiadający tą samą nazwę, co plik danych doświadczalnych, z rozszerzeniem PUR)
6. następnie uruchamiamy po kolei:
 - 6.1. Background (odejmowanie tła)
 - 6.2. Auto Run (należy wpisać nazwę pliku z rozszerzeniem PUR lub po wciśnięciu klawisza Enter wybrać plik z listy))
 - 6.3. Enter (powstaje plik z rozszerzeniem SUB)
7. aby zarejestrować ilość refleksów i ich położenie uruchamiamy kolejno:
 - 7.1. Peaks – polecenie umożliwia znajdowanie położenia refleksów (maksimów intensywności) na analizowanym dyfraktogramie
 - 7.2. Auto Run (należy wpisać nazwę pliku z rozszerzeniem SUB)
 - 7.3. Enter
8. aby zidentyfikować zarejestrowane refleksy (tzn.: znaleźć ich położenie oraz intensywność względną) wychodzimy z Graphics (Esc...) i wchodzimy, w menu głównym, do:

² efekty każdego z etapów opracowania danych możemy obejrzeć wybierając komendę Graphics , z menu głównego (do którego wracamy przez: Utilities, Exit), a następnie polecenia:

Draw; Win1 i z kolei: wpisujemy nazwę pliku, który chcemy obejrzeć z rozszerzeniem .SUB – co powoduje pojawienie się na ekranie ciągłego dyfraktogramu naszej próbki.

- 8.1. Archives
 - 8.2. Utilities
 - 8.3. New File (należy wpisać nazwę pliku z rozszerzeniem **.PKS**)
 - 8.4. w zakładce: Search/match
 - 8.5. Run – w efekcie pojawi się lista wszystkich wzorców, które program uznał za pasujące do dyfraktogramu eksperymentalnego LUB
 - 8.6. w zakładce: Extract
 - 8.7. komenda Formula (pozwala na przeszukiwanie bazy np.: po wzorze substancji chemicznej, której obecność w próbce chcemy potwierdzić, np. Fe_2O_3 , Ca S O, itp.)
 - 8.8. w odpowiedzi pojawi się lista wzorców, które pasują do dyfraktogramu eksperymentalnego – chcąc wybrać właściwe wzorce, należy porównać dopasowanie położenia refleksów wzorca do refleksów badanej próbki wybierając komendę D
 - 8.9. uwaga: należy zapisać sobie numery kart pasujących wzorców oraz zachować te karty wybierając S (przy numerze kart wzorca pojawi się znak ”+”)
9. aby dokonać potwierdzenia identyfikacji składników analizowanego dyfraktogramu należy wyjść do menu głównego, a następnie uruchomić:
- 9.1. Graphics
 - 9.2. Draw
 - 9.3. Win1
 - 9.4. należy wpisać nazwę pliku z analizowanym widmem z rozszerzeniem .SUB (np. LEK1.SUB)
 - 9.5. aby nałożyć wybrane w Archives dyfraktogramy wzorcowe na dyfraktogram eksperymentalny badanego leku należy:
 - 9.6. Draw
 - 9.7. Win 1
 - 9.8. Po komunikacie „File to...” wciskając Enter wybieramy z listy wzorcowy dyfraktogram lub wpisujemy numer karty zaznaczonego wcześniej w Archives wzorca, np.: 05-0987.PKS
 - 9.9. Po komunikacie „Arrows/Sticks” wybieramy S, co pozwala na naniesienie refleksów substancji wzorcowej na refleksy z dyfraktogramu eksperymentalnego; uwaga: identyfikacja fazy jest możliwa, gdy położenie refleksów wzorca i próbki analizowanej jest zgodne (refleksy nakładają się na siebie).
10. Gdy zidentyfikujemy wszystkie refleksy możemy analizowany dyfraktogram wydrukować lub skopiować do programu Word lub Photo Editor; w tym celu po wybraniu opcji Print Scrn, wklejamy rysunek do programu Photo Editor, robimy negatyw, wycinamy interesujący nas fragment obrazu i wklejamy do np.: dokumentu w programie Word.

UWAGA!

- aby powrócić do menu głównego **ZAWSZE** w zakładce: Utilities należy wybrać polecenie Exit.

Tabela 1. Warunki pracy proszkowego dyfraktometru rentgenowskiego X'PERT (firmy Philips)

Generator	PW 1830
Goniometr	PW 3020 (pionowy)
Detektor	Pw 1711 (proportional detector)
Licznik	PW 3719
Moduł kontrolny	PW 3710
Lampa	Cu, <i>Long Fine Focus</i>
Promieniowanie	CuK α ($\lambda = 0.15418$ nm)
Napięcie	40 kV
Natężenie	30 mA
Zakres pomiarowy kąta 2θ	5-100 stopni
Wielkość kroku	0,05 stopnia
Czas pomiaru pojedynczego impulsu	2 sekundy

SPRAWOZDANIE

Sprawozdanie może zawierać bardzo krótki opis zastosowanej procedury i stosowanej metody pomiarowej, natomiast MUSI zawierać opis zidentyfikowanych składników preparatu oraz rysunek, na którym dyfraktogram badanego preparatu zestawiony będzie z dyfraktogramami wzorców zidentyfikowanych faz.

LITERATURA

1. Trzaska Durski Z., Trzaska Durska H., *Podstawy krystalografii strukturalnej i rentgenowskiej*, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 1997
2. Bojarski Z., Łągiewka E., „Rentgenowska analiza strukturalna” PWN Warszawa 1988
3. Szczepaniak W., *Metody instrumentalne w analizie chemicznej*, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 1996
4. Cygański A., *Metody spektroskopowe w chemii analitycznej*, Wydawnictwa Naukowo-Techniczne, Warszawa 1997