

Tecniche di caratterizzazione

Utilizzando varie tecniche ho la certezza dell'interpretazione dello stato solido del mio campione



Tecniche di caratterizzazione

- Metodi termici:

Analisi termogravimetrica (TGA)

Calorimetria differenziale a scansione (DSC)

Termomicroscopia (HSM)

Analisi Termomeccanica (TMA)

- Metodi con raggi X:

Diffrazione ai raggi X di polveri (PXRD) e del cristallo singolo

- Metodi spettroscopici:

FTIR/Raman/NIR

NMR

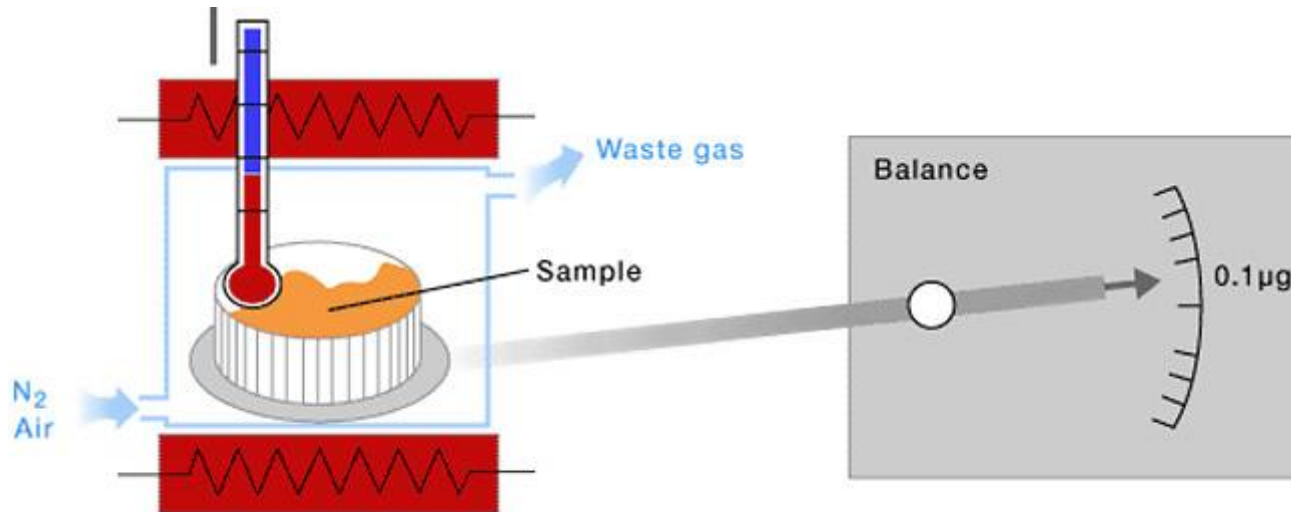
- Microscopio a scansione elettronica



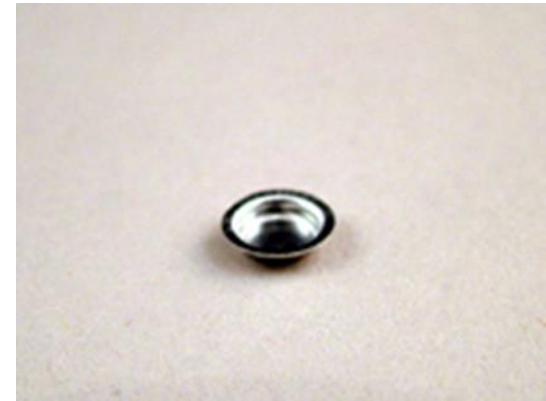
Ci sono inoltre
strumenti accoppiati
che svolgono
contemporaneamente
2 analisi
(per es. TGA/DSC; PXRD
riscaldando; ...)

Analisi termogravimetrica (TGA)

- Misurazione della perdita di peso di un campione in funzione del programma di riscaldamento applicato
- fornisce dati sulla composizione del campione



- Preparazione del campione: pongo una quantità di polvere **accuratamente pesata** in crogiolo di Allumina (pochi mg)



- Sottopongo ad un programma di riscaldamento
- Valuto la perdita di peso in funzione del riscaldamento (n.b. peso il campione costantemente durante l'analisi!!!)



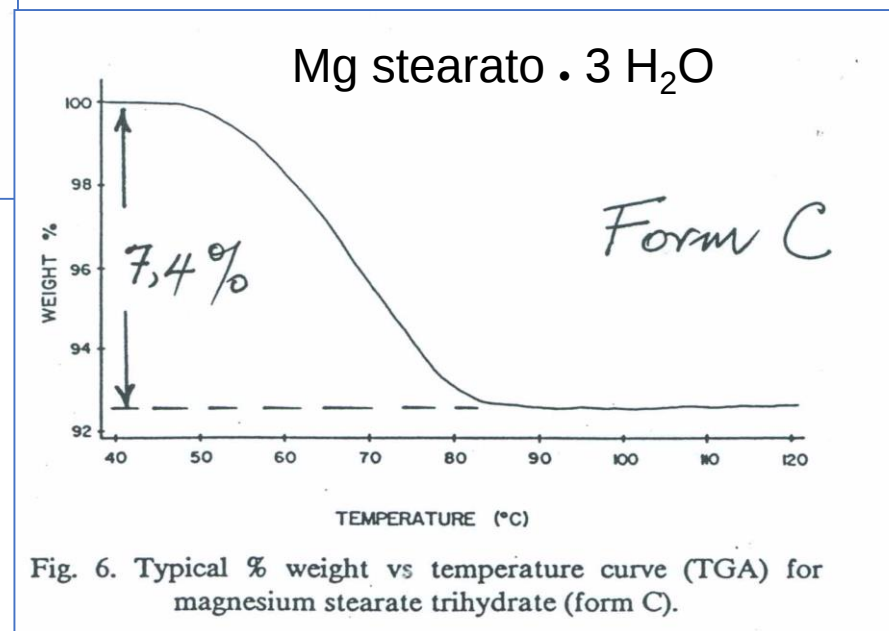
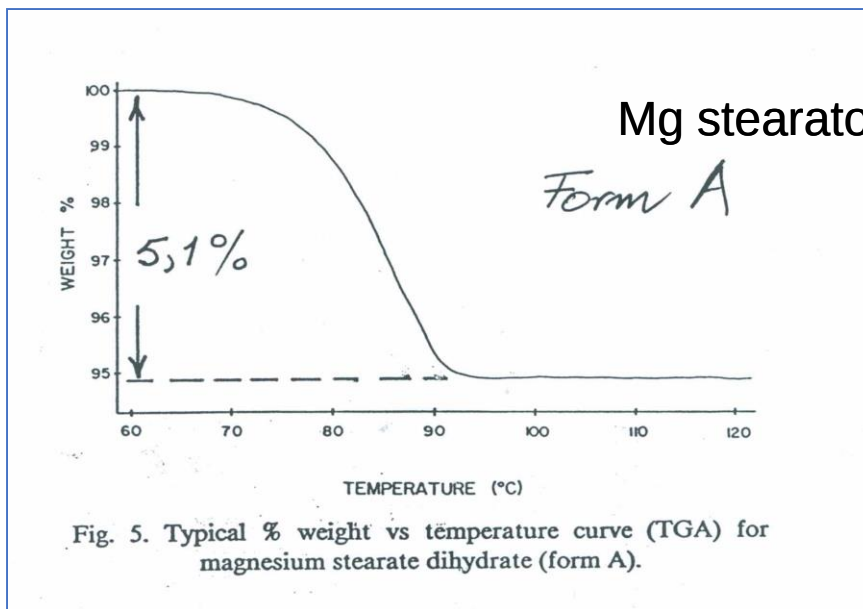
Ottingo un TERMOGRAMMA
(%PESO vs TEMPERATURA)

Principali applicazioni :

- quantificazione del contenuto di solvente volatile
- determinazione della temperatura di degradazione

Magnesio stearato

(lubrificante ad es. per compresse)

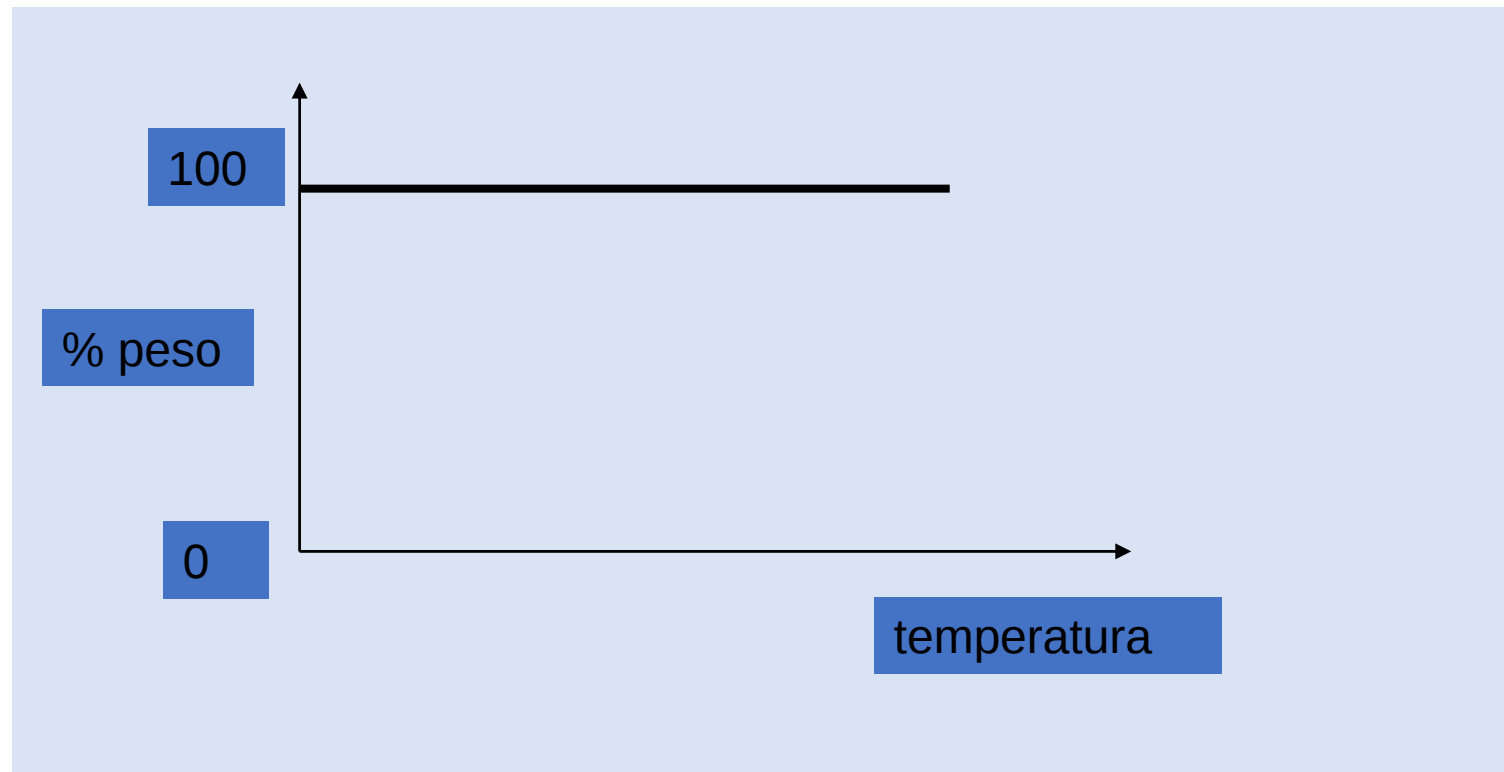


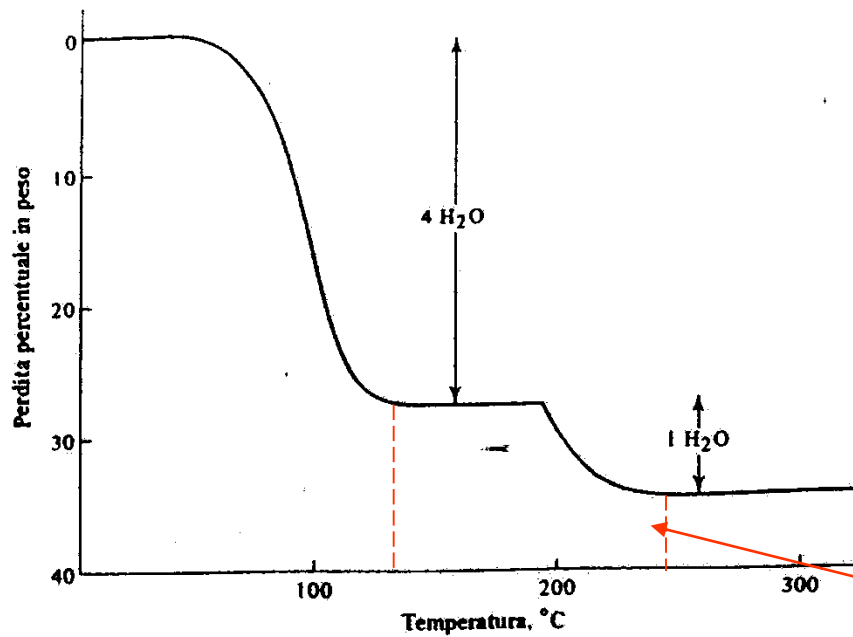


E la forma anidra?

- Forma B = anidra non perde peso durante il riscaldamento!!!
(almeno fintantoché non si degrada)

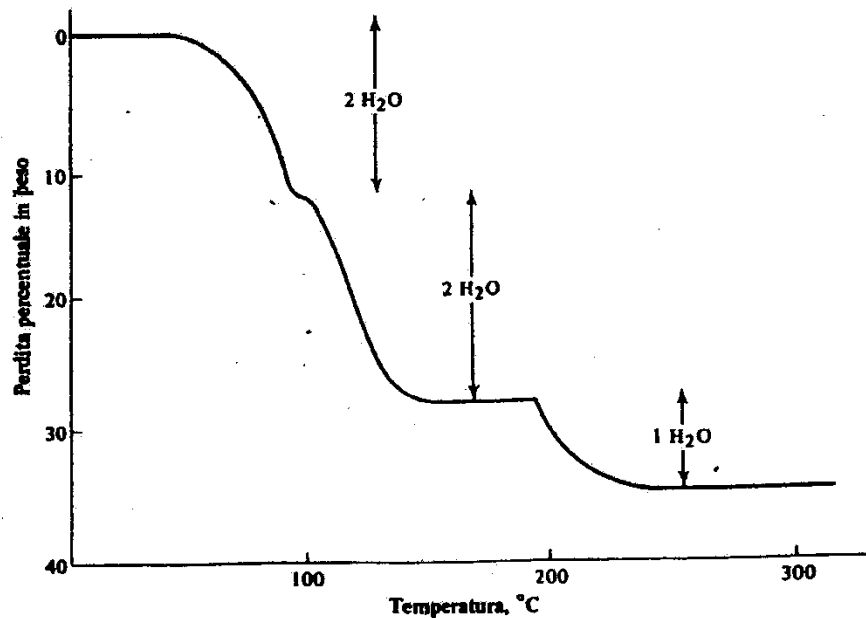
termogramma





Dalla temperatura a cui viene perso il solvente ho informazioni sul tipo (la forza) del
legame con il solvente stesso da parte della struttura

termogramma che si ottiene per riscaldamento rapido del $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$



termogramma che si ottiene per riscaldamento lento del $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$.

Calorimetria a scansione differenziale (DSC)

Preparazione campione:

- (come per TGA) polvere, accuratamente pesata, in crogiolo (pochi mg)

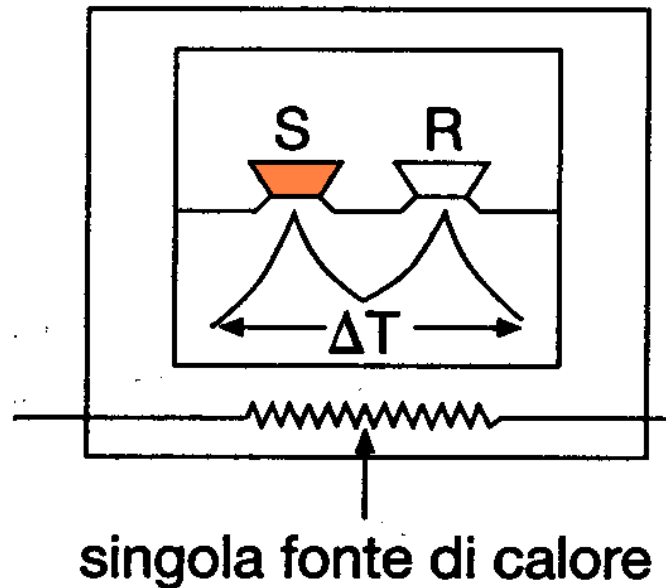


DSC

Principio: un flusso di calore differenziale tra campione e riferimento permette di caratterizzare eventi endotermici ed esotermici che avvengono nel campione in analisi

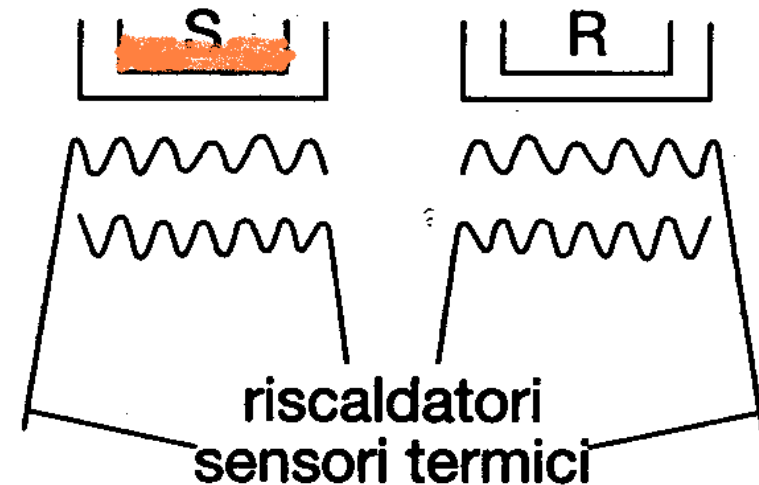
2 tipi di DSC

(a)



Flusso di calore

(b)



Compensazione di potenza

- Se la reazione è **endotermica** la temperatura del campione sarà inferiore a quella del riferimento
- Se la reazione è **esotermica** la temperatura del campione sarà maggiore rispetto al riferimento

Termogramma:

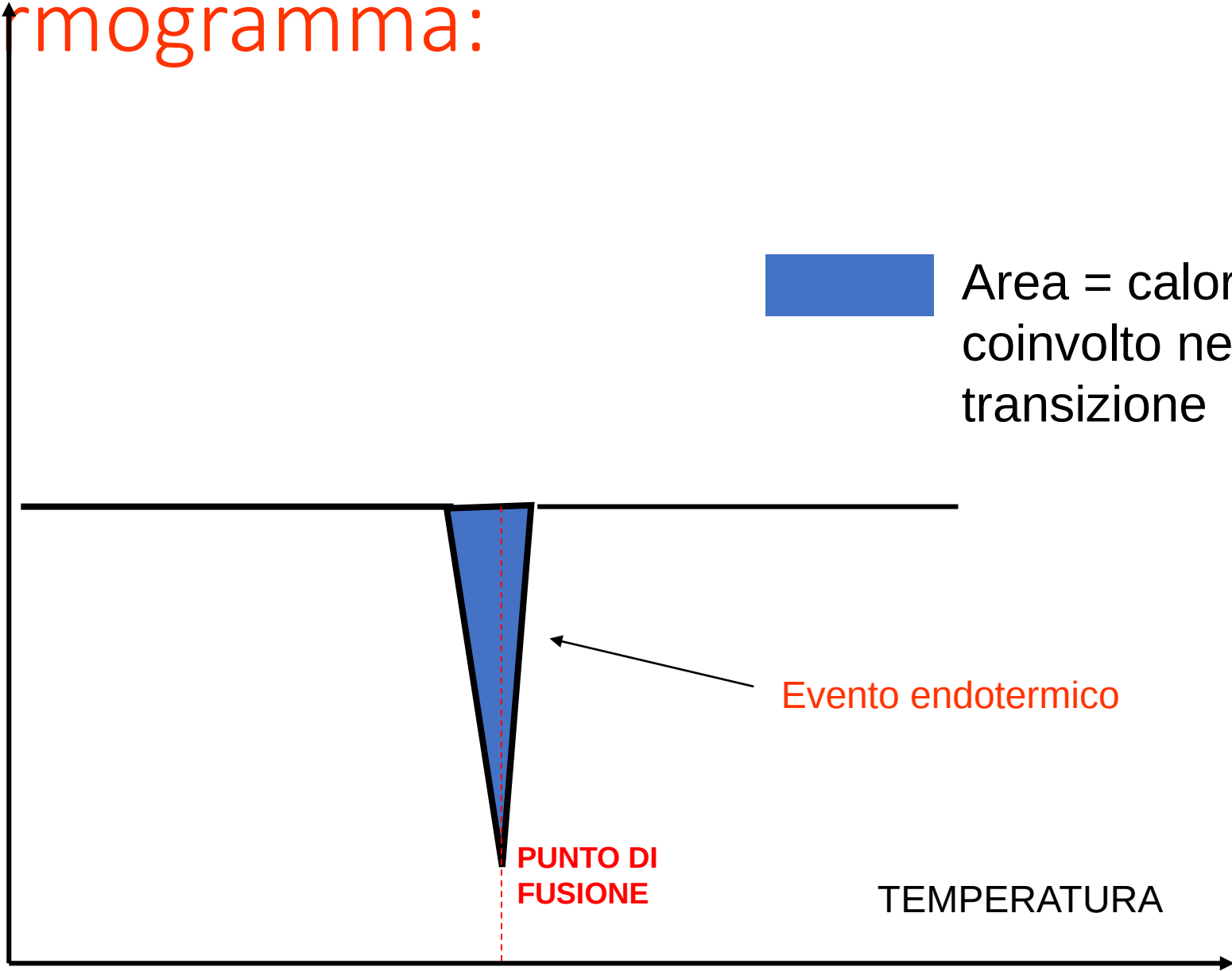
↑
E
X
O

Area = calore
coinvolto nella
transizione

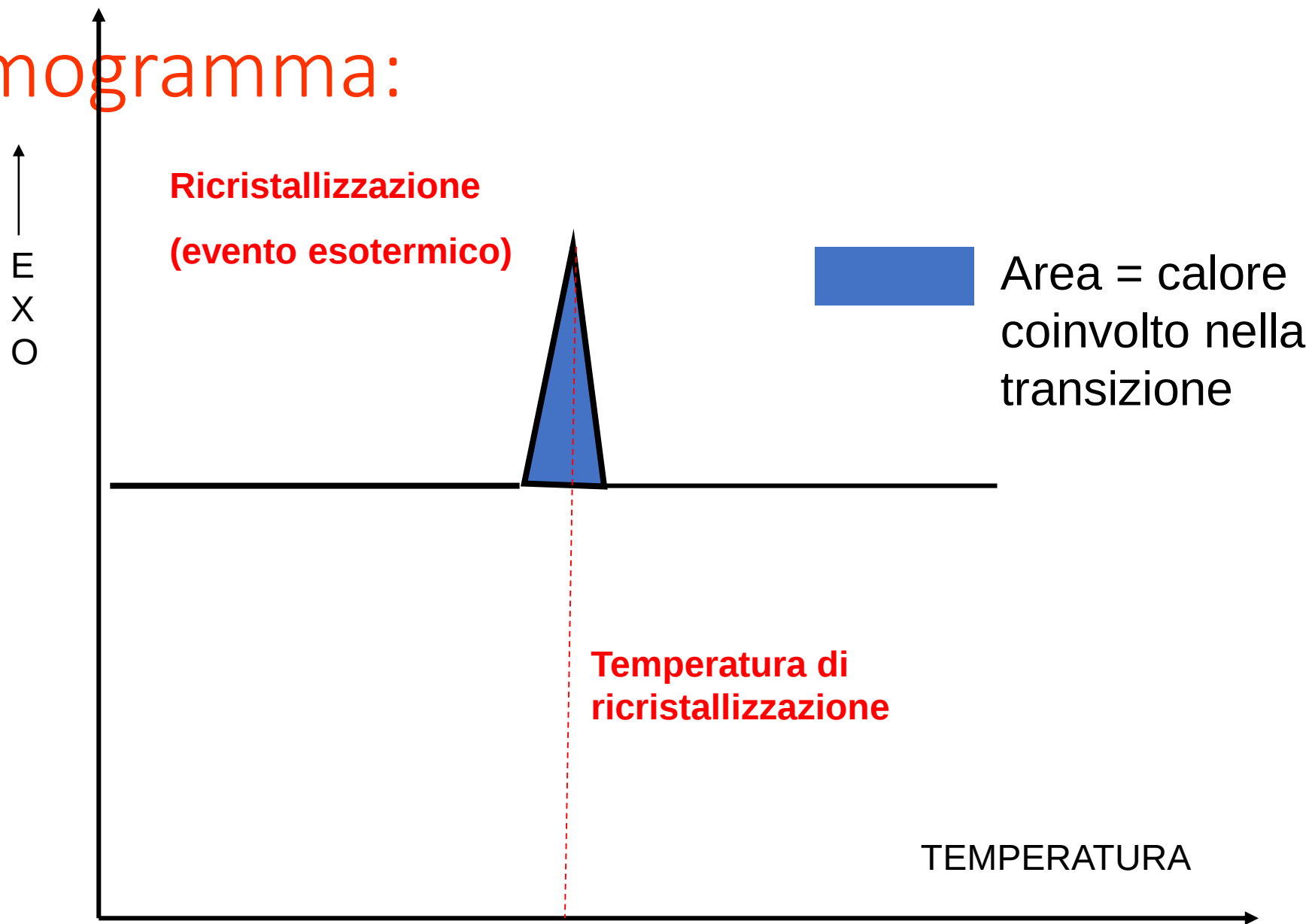
Evento endotermico

PUNTO DI
FUSIONE

TEMPERATURA



Termogramma:

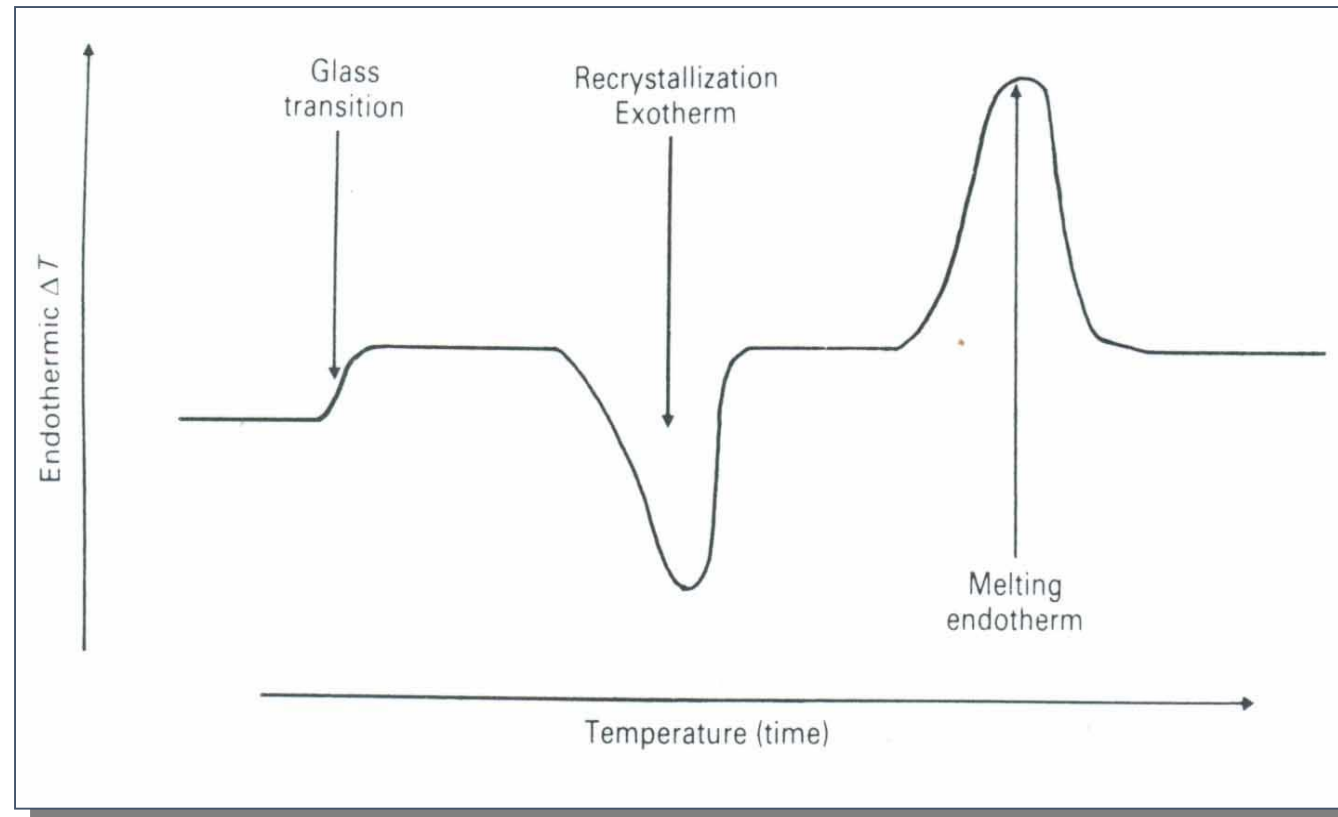


Usi principali:

determinazione e quantificazione di eventi endotermici (+):
desolvatazione, sublimazione, **fusione**, transizioni di fase

determinazione e quantificazione di eventi esotermici (-):
decomposizione, transizione monotropiche, cristallizzazione

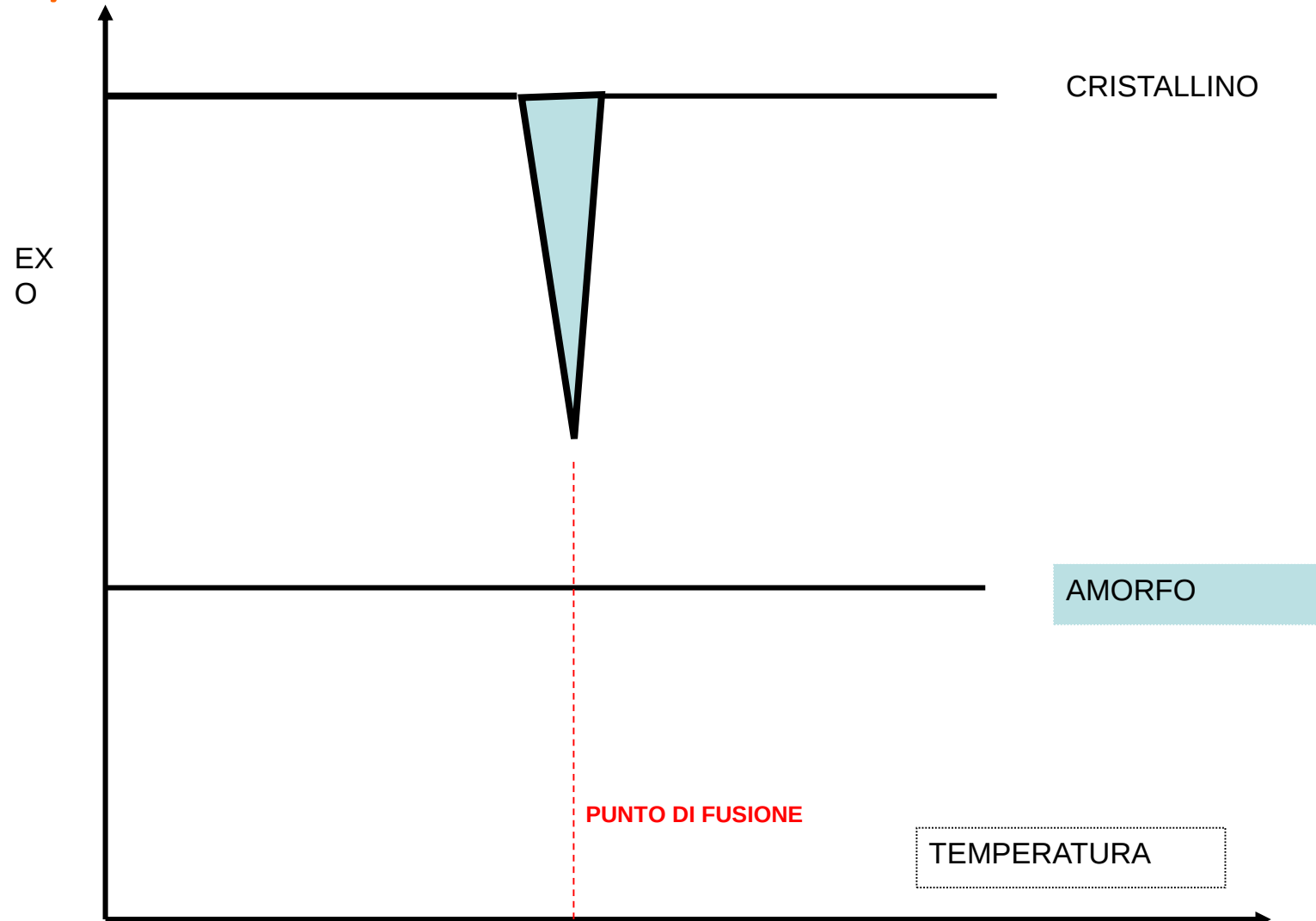
A.U.C.
proporzionale
all'Entalpia



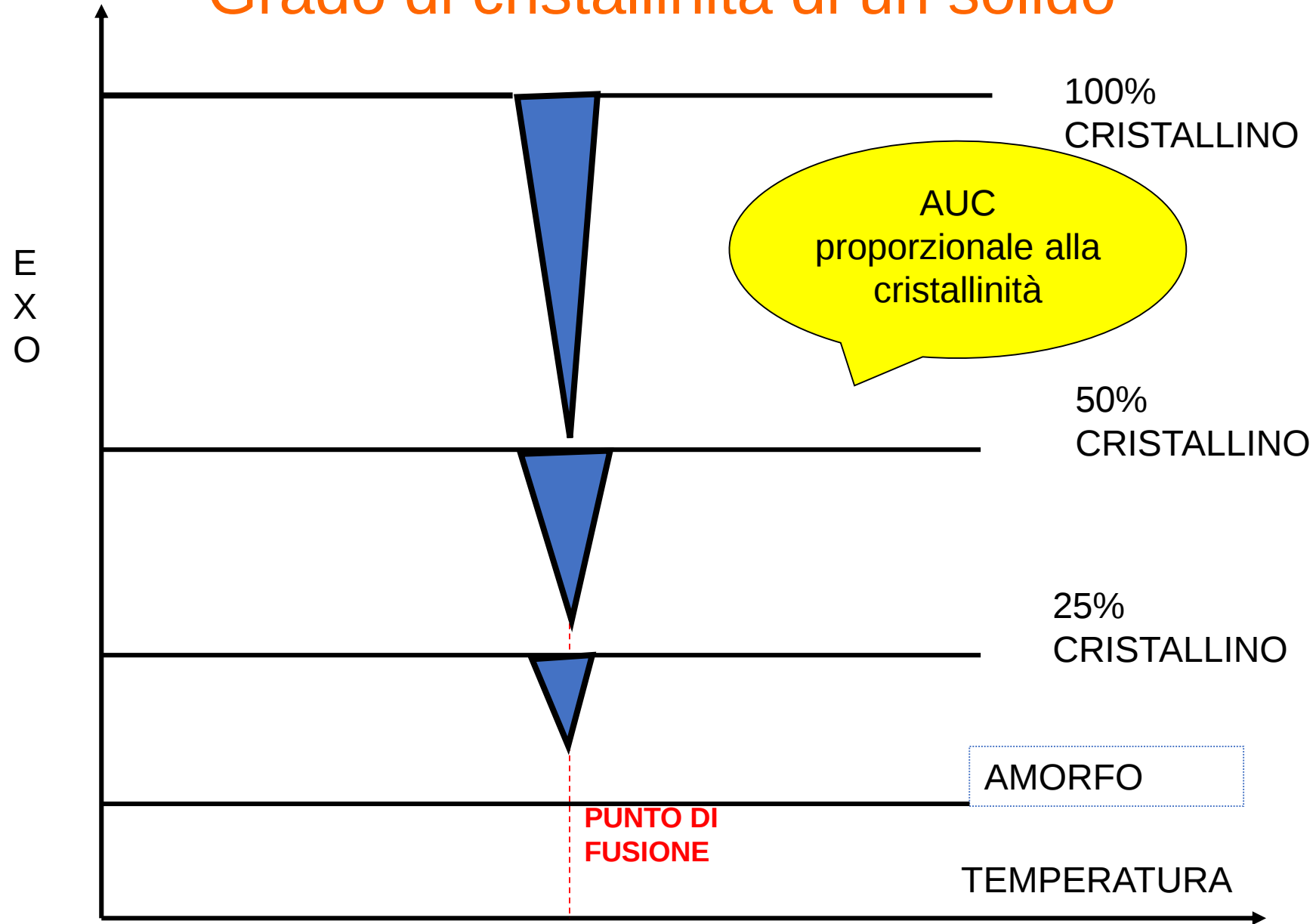
Alcune applicazioni della DSC nell'analisi di singoli componenti

- Determinazione del p.f. di p.a. (utile per distinguere polimorfi)
- Idrati/solvati : temperatura di evaporazione del solvente, quantità di solvente presente, stabilità delle molecole di solvente nel reticolo
- Grado di cristallinità di un solido
- Presenza di impurezze
- Temperatura di transizione vetrosa

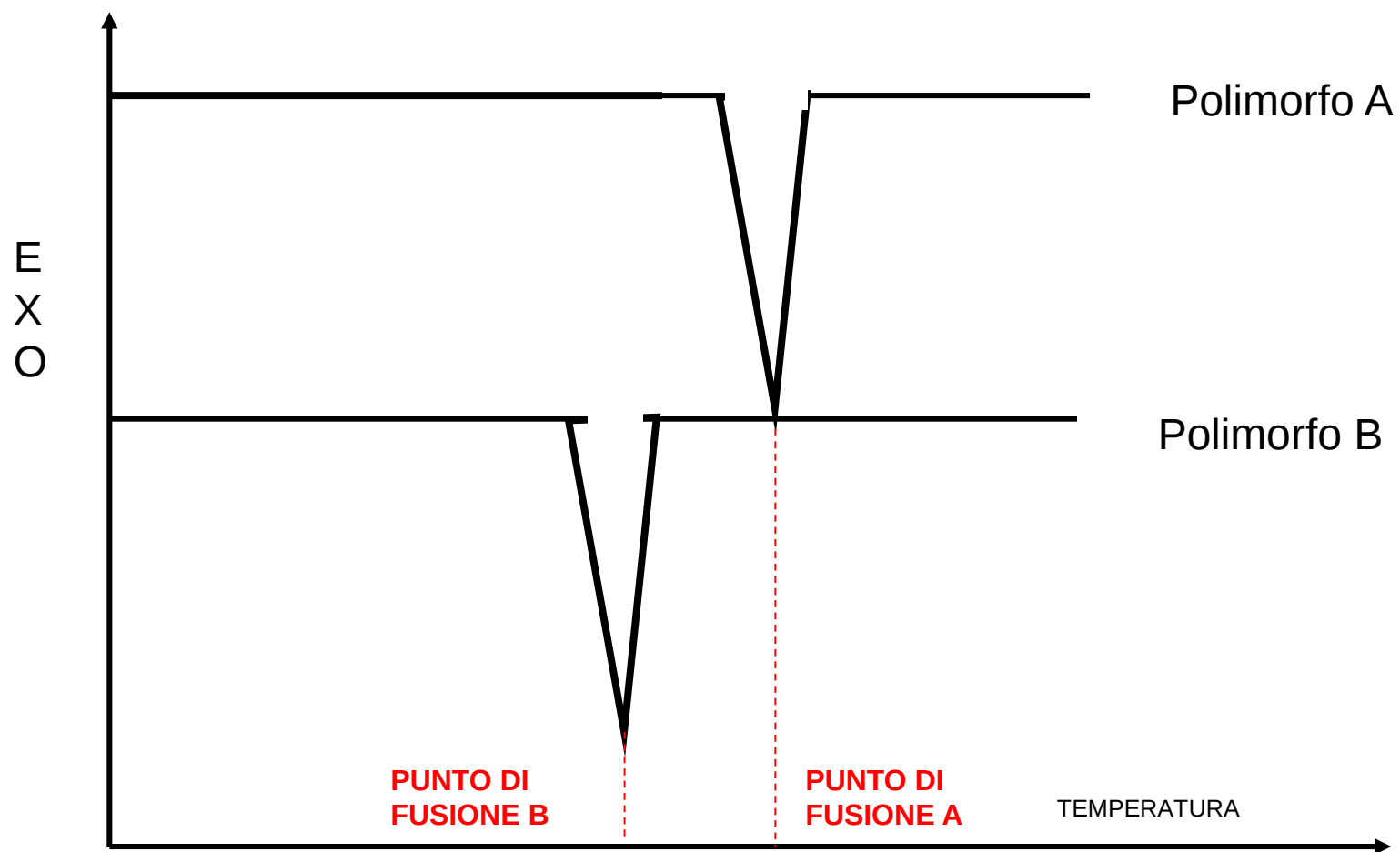
Amorfo/cristallino



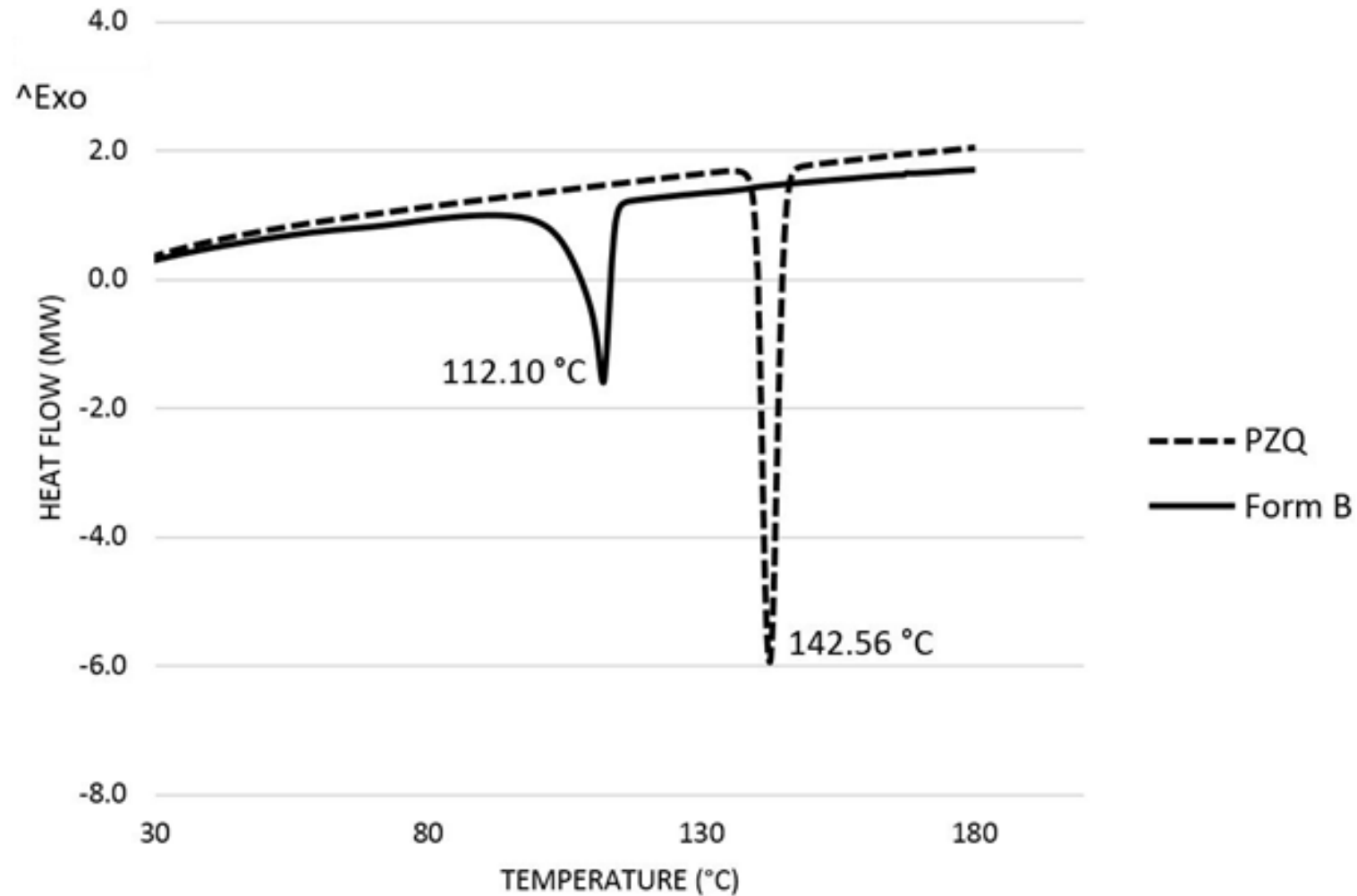
Grado di cristallinità di un solido



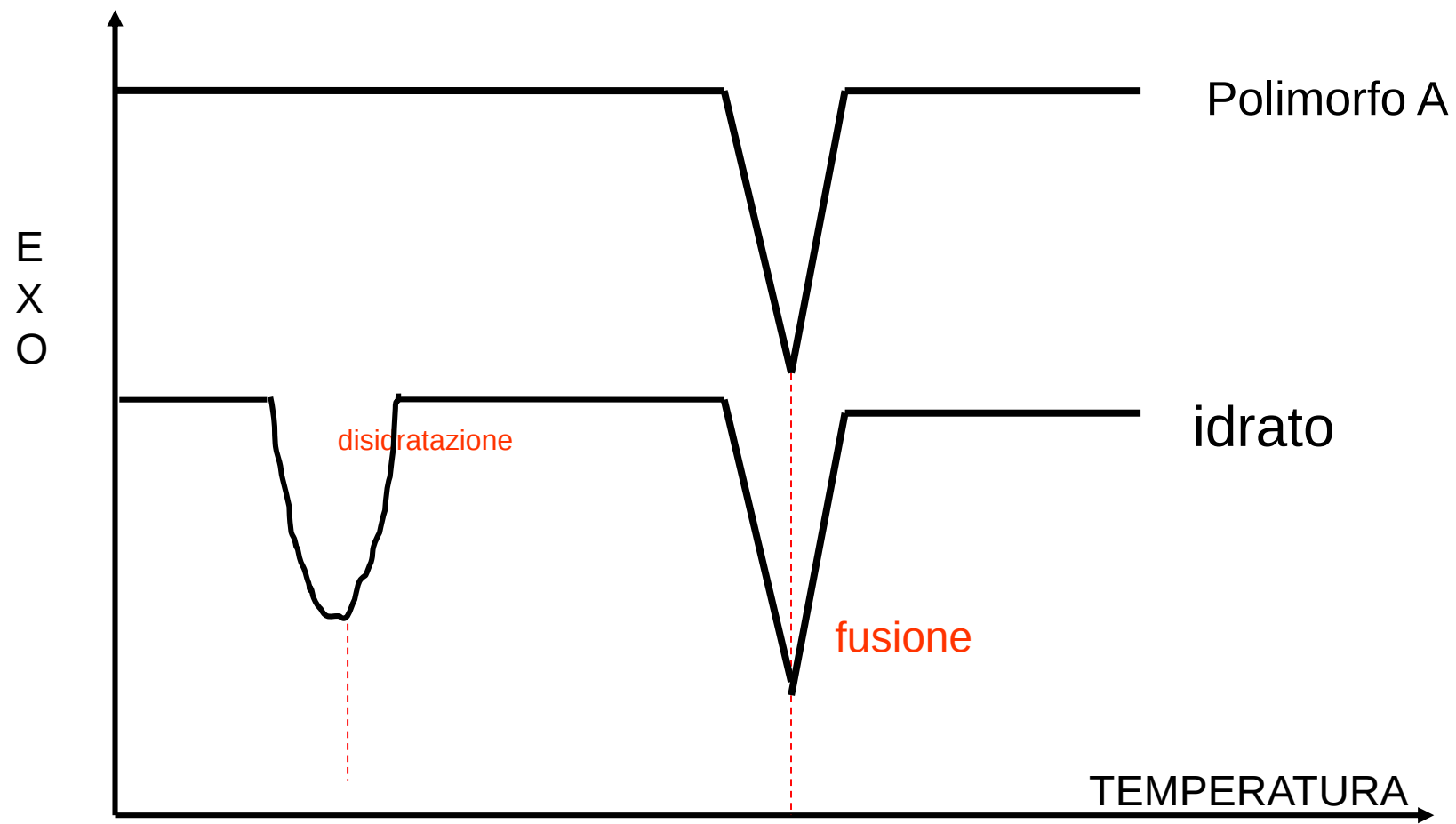
Polimorfi diversi



Distinzione tra polimorfi anidri



Anidro/idrato vero



Distinzione tra polimorfi e IDRATI: niclosamide

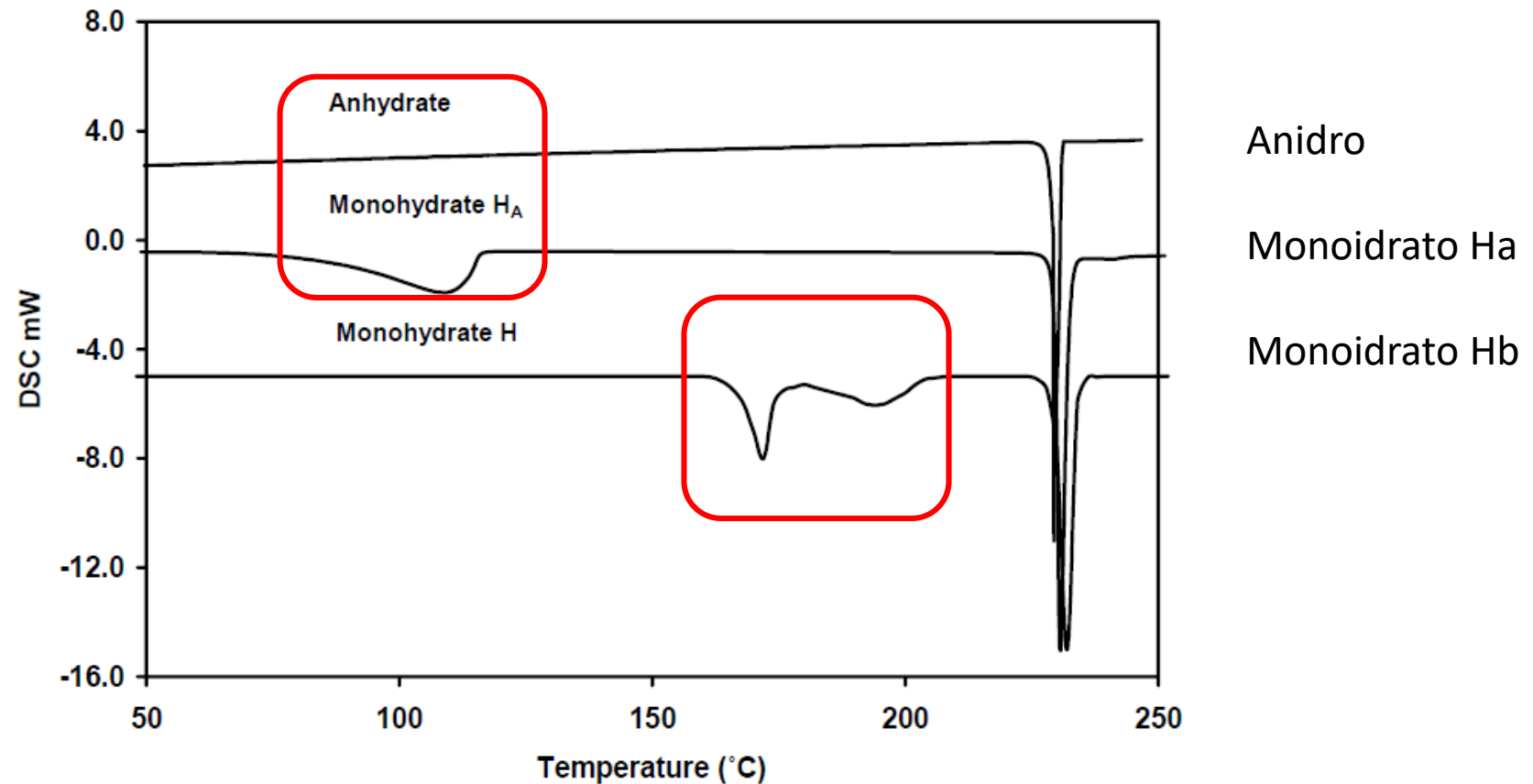
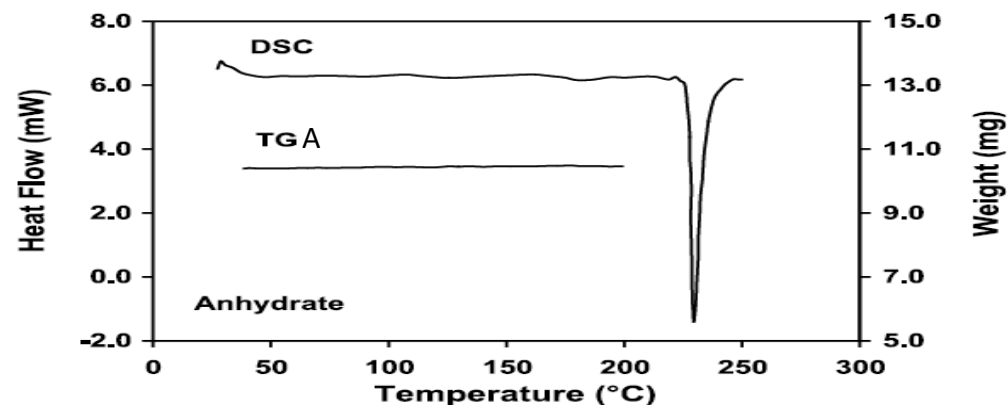


Fig. 4. DSC curves of the niclosamide anhydrate, monohydrates H_A and monohydrate H_B.

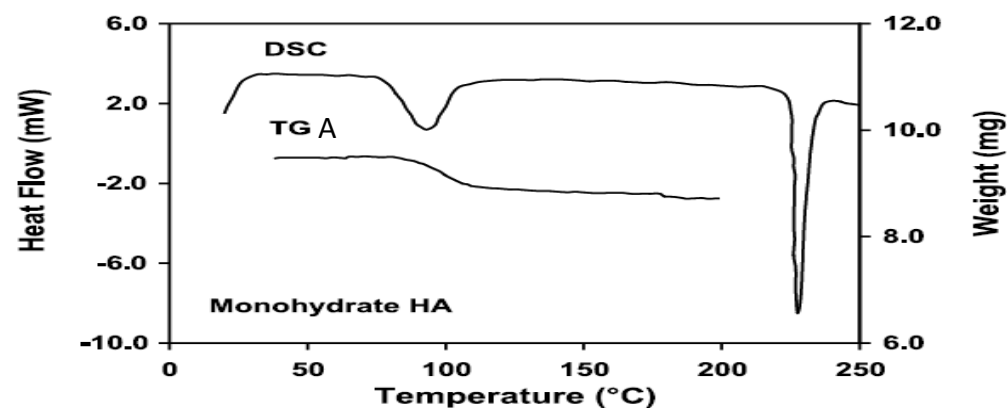
Anidro/idrato

niclosamide

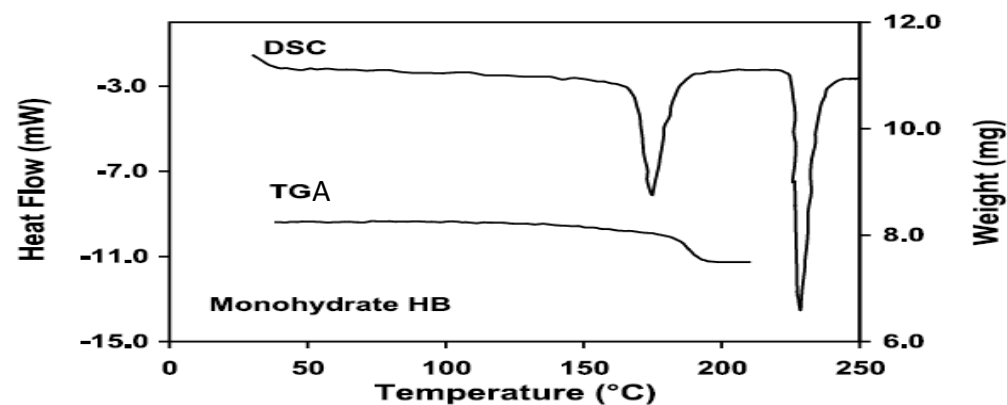
TGA/DSC



anidro



monoidrato

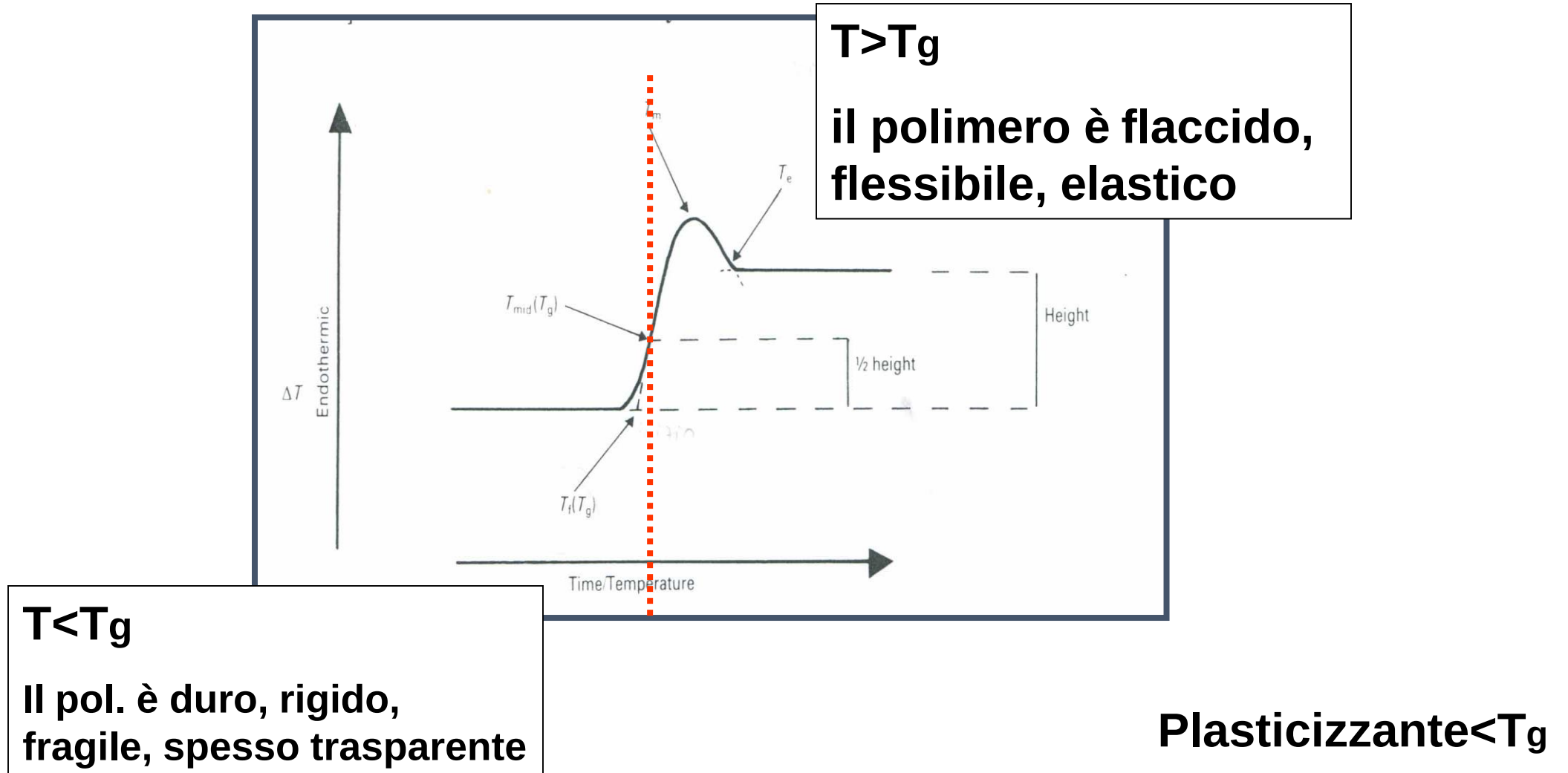


monoidrato

Figure 2. DSC and TG thermograms of the niclosamide anhydrous and two monohydrates.

RAMMOLLIMENTO

Temperatura di transizione vetrosa (T_g)



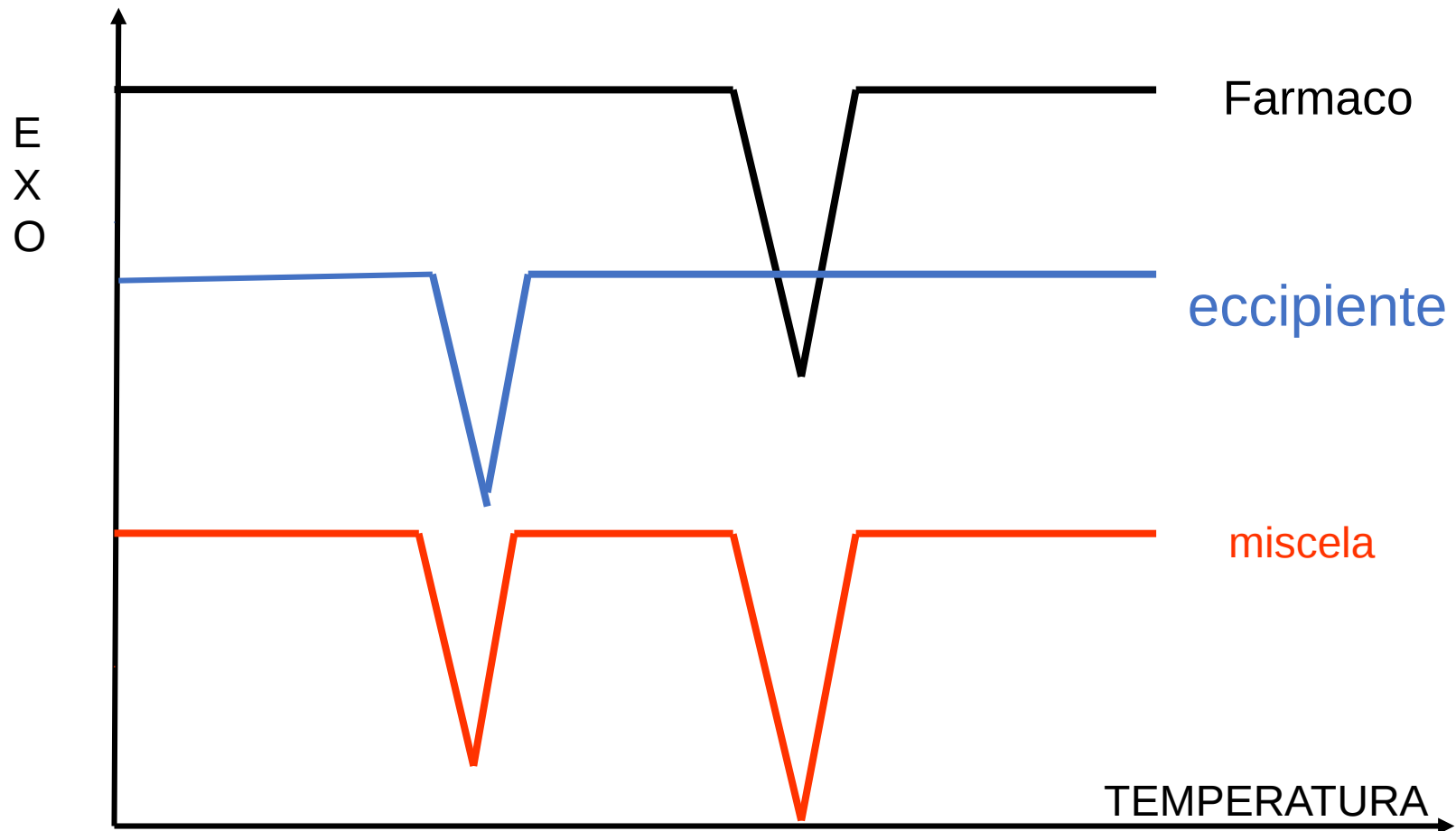
Altri

ESEMPI DI APPLICAZIONI DELLA DSC

- Interazione tra farmaco ed eccipiente

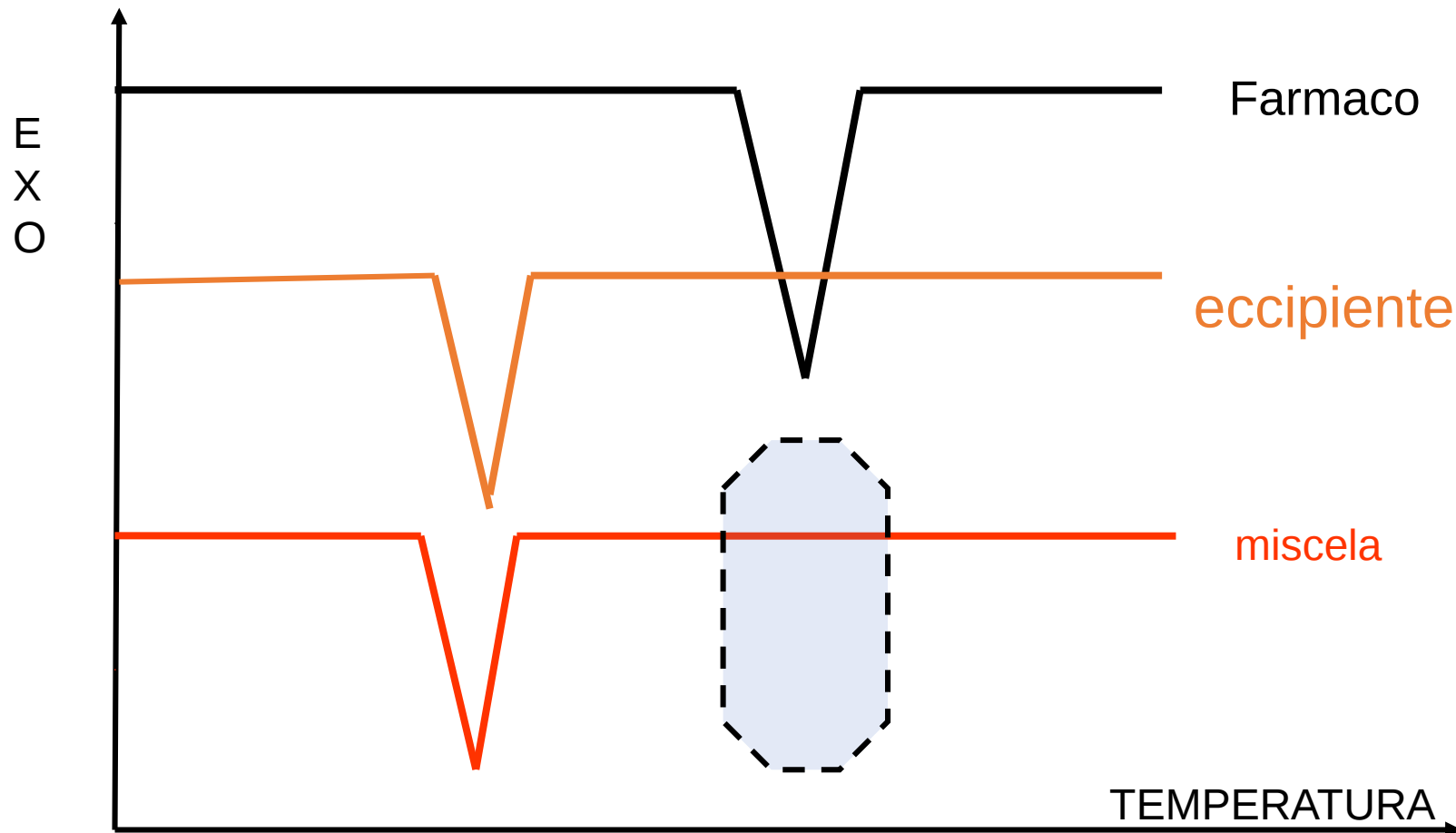
Se F. ed E. sono compatibili:

- La miscela darà termogramma somma dei due componenti



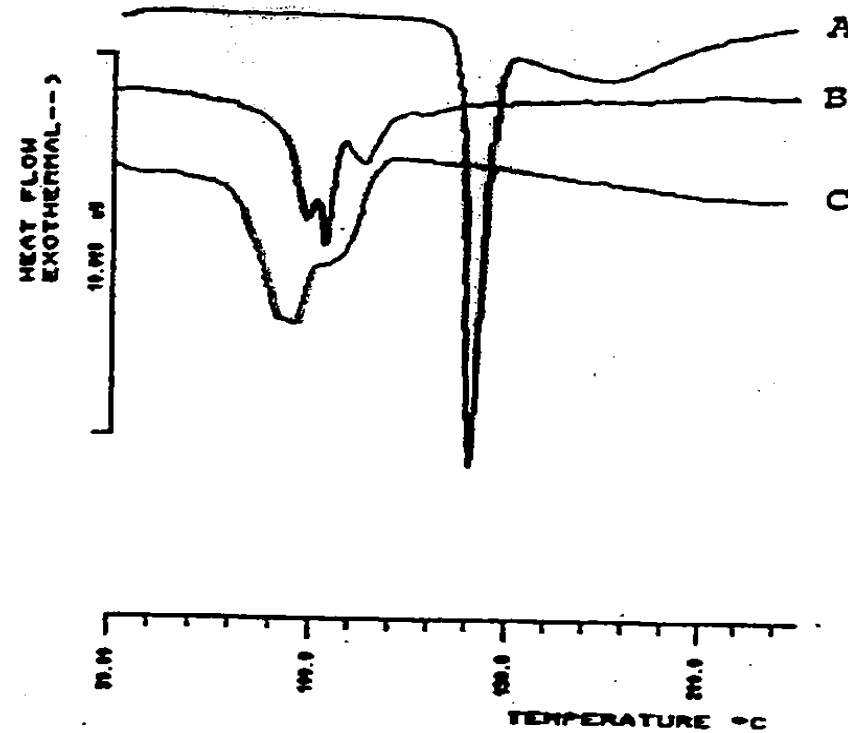
Se F. ed E. NON sono compatibili:

- IL termogramma della miscela non darà somma dei due componenti



(INCOMPATIBILITÀ TRA FARMACO ED ECCIPIENTE)

Se F. ed E. NON sono compatibili



- A) FARMACO
- B) ECCIPIENTE
- C) MISCELA FARMACO + ECCIPIENTE

Termomicroscopia (HSM)

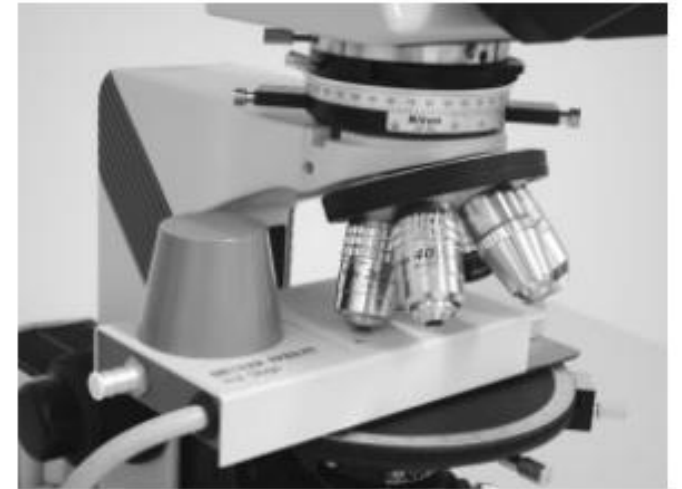
- Principio: l'aspetto del solido di solito cambia durante il riscaldamento, specialmente nel corso di conversioni di fase

Preparazione campione

Su un vetrino da microscopio pongo qualche granello di campione e riscaldo il campione



Poi osservo al m.o.

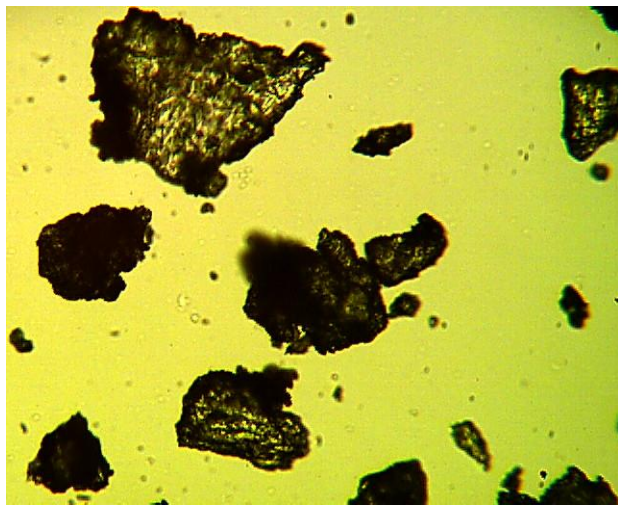


- Apparecchiatura: microscopio collegato ad un controllo dinamico della temperatura
(-50°-350°C)
- Preparazione del campione : semplicemente si pone su un vetrino per microscopio uno strato sottilissimo di polvere

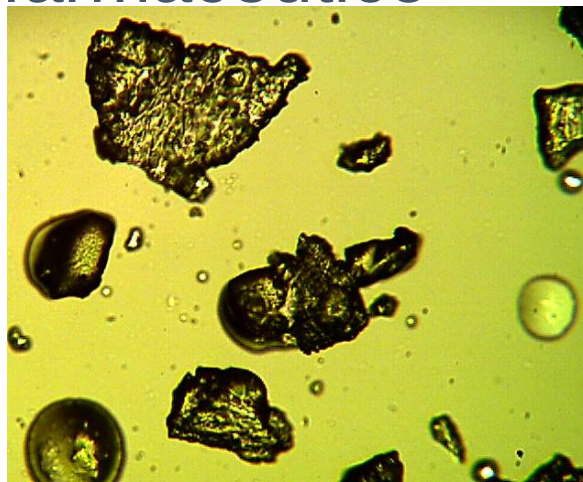
Applicazioni:

- 1.correlazione visiva degli eventi termici registrati con TGA e DSC
- 2.misura accurata della T. di fusione o di desolvatazione

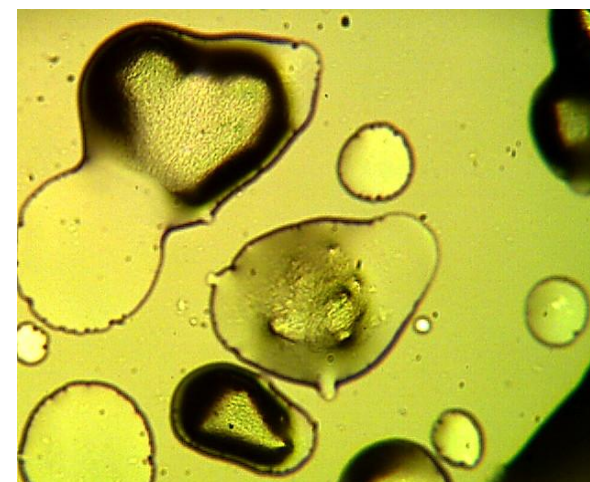
Analisi termomicroscopica di un polimero farmaceutico



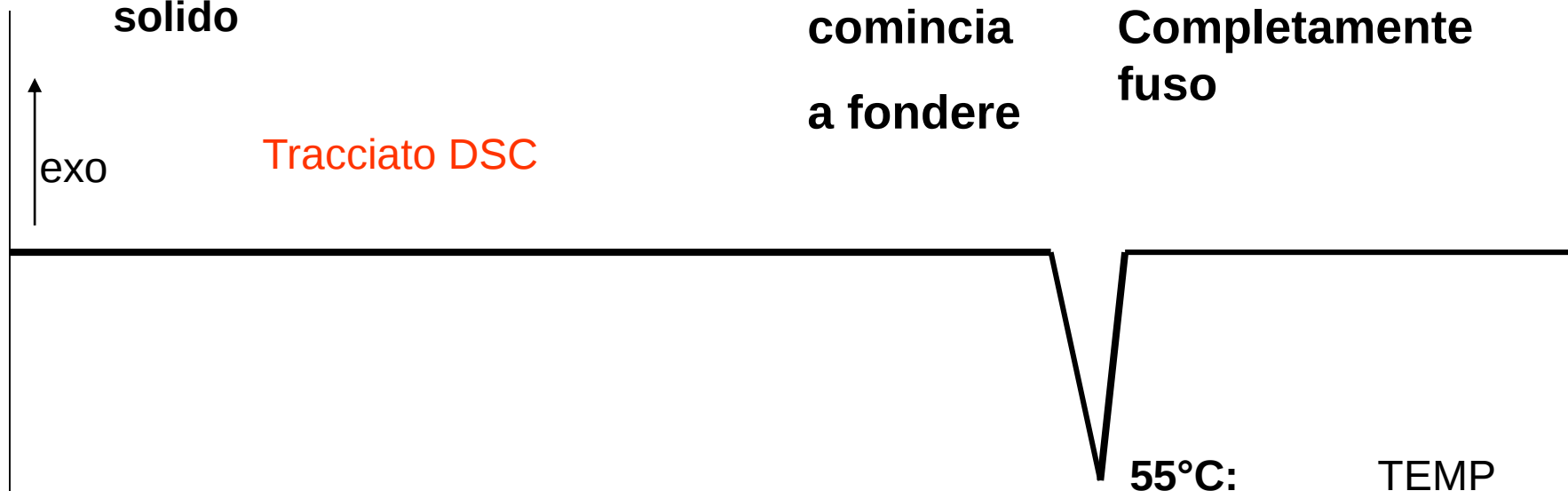
30°C: il polimero è solido



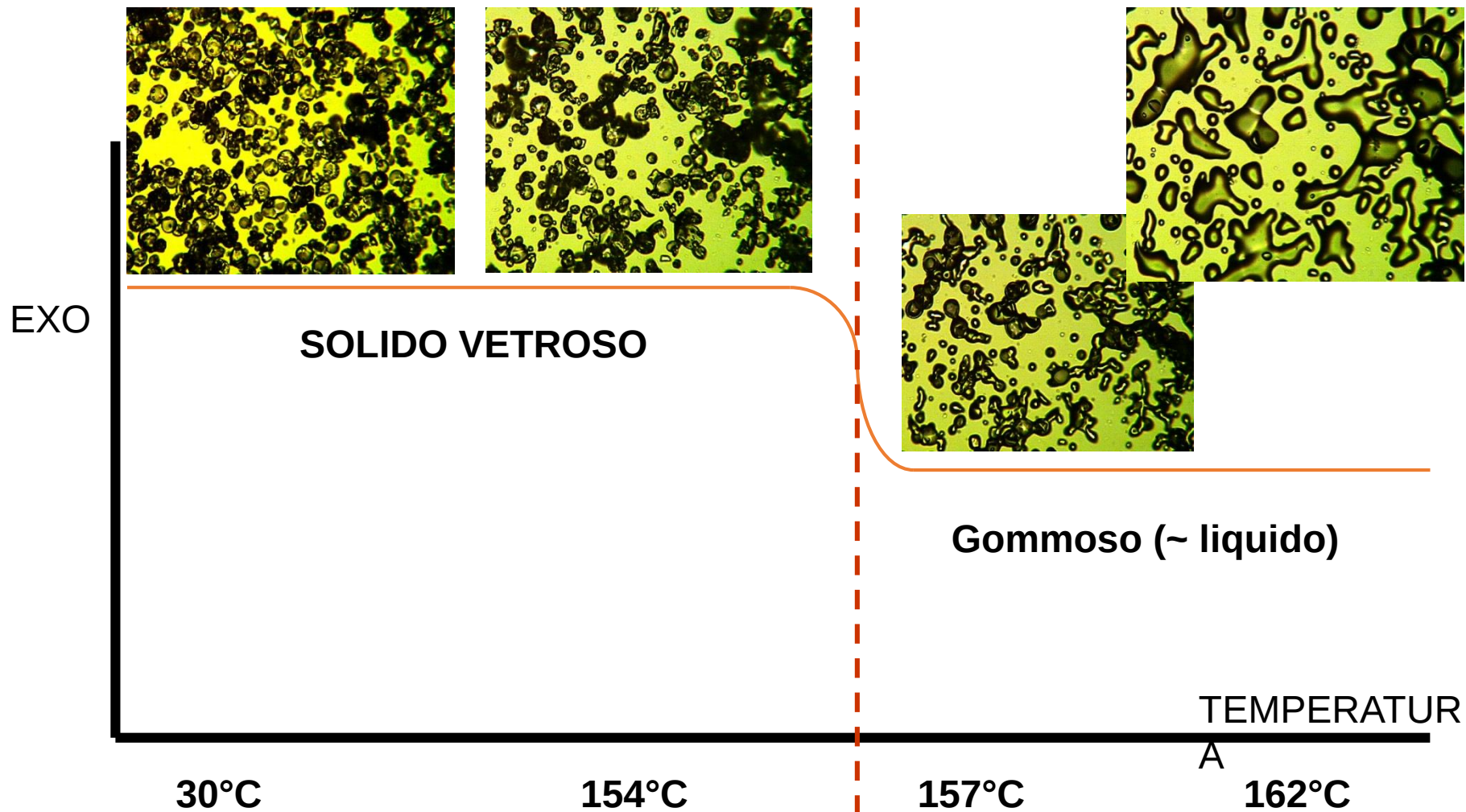
54°C:
comincia
a fondere



55°C:
Completamente
fuso

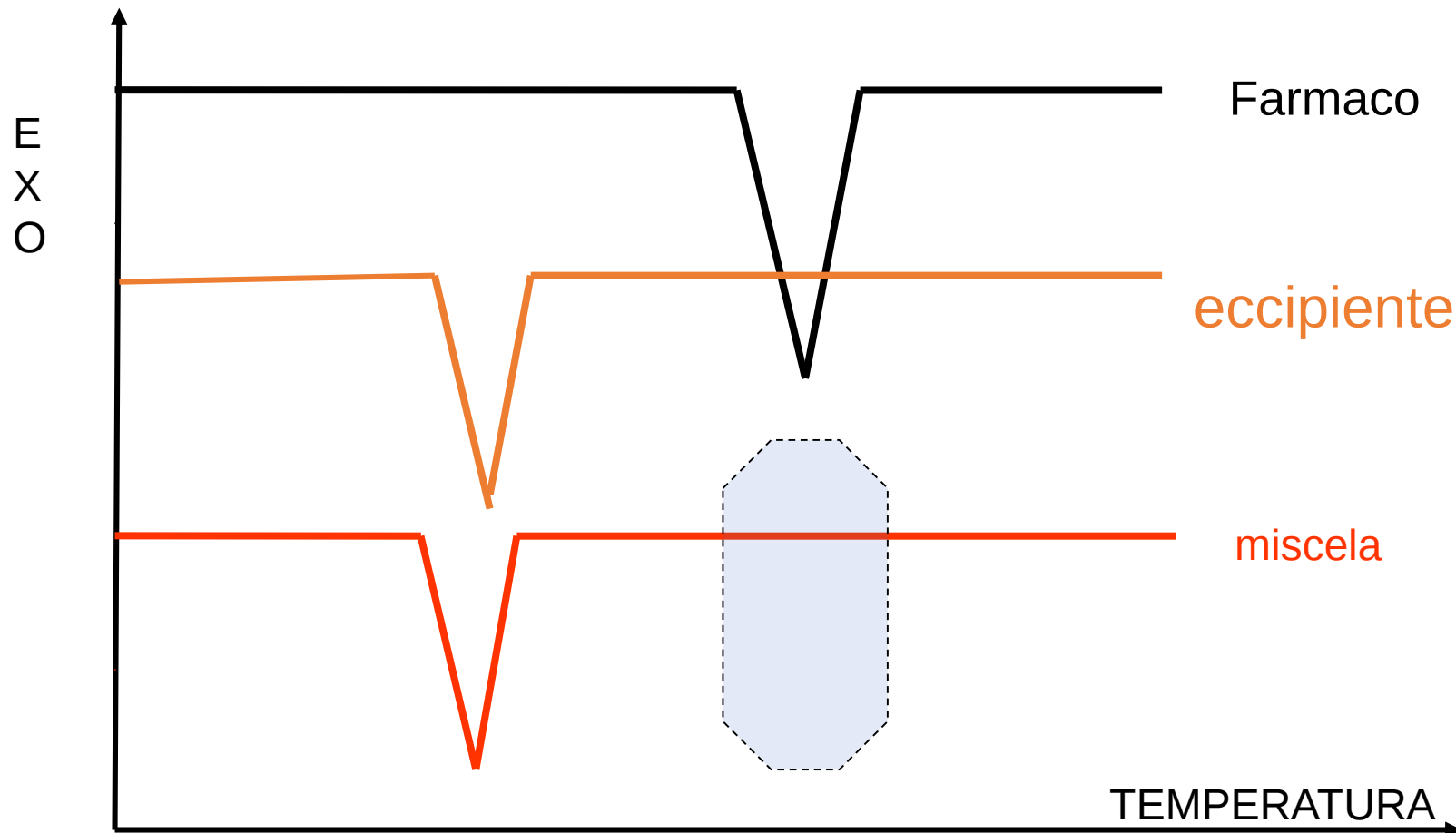


Transizione vetrosa di un polimero amorfo al termomicroscopio/ DSC



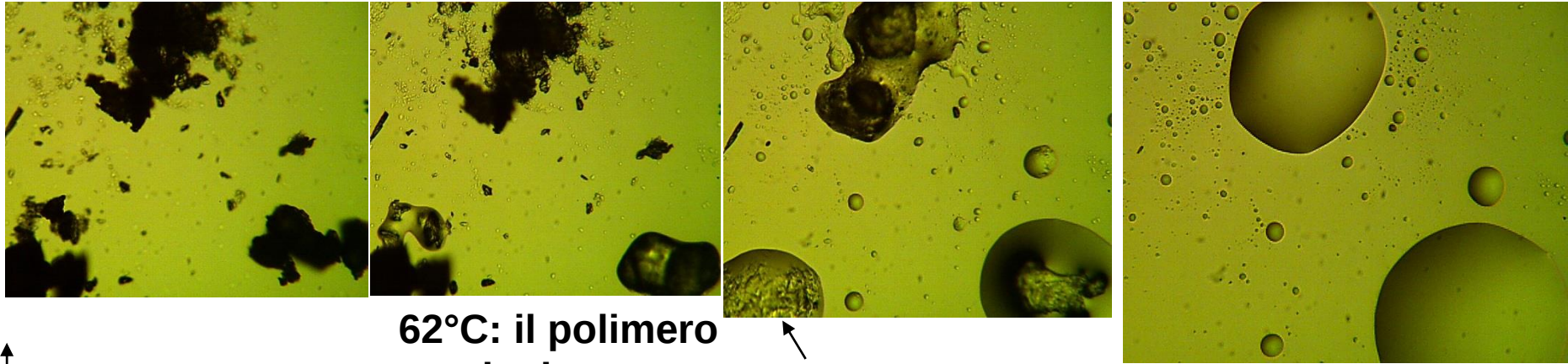
VERIFICA DI INCOMPATIBILITA'

- IL termogramma della miscela non darà somma dei due componenti



Farmaco che si scioglie nel polimero fuso (termomicroscopio)

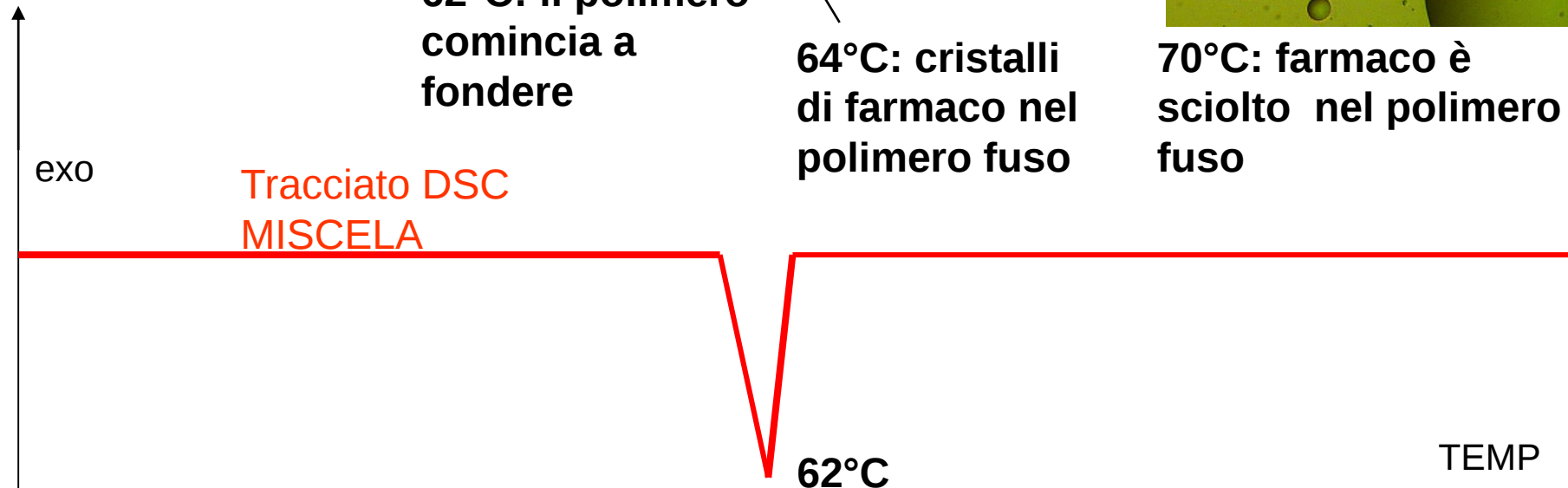
30°C: tutto solido



**62°C: il polimero
comincia a
fondere**

**64°C: cristalli
di farmaco nel
polimero fuso**

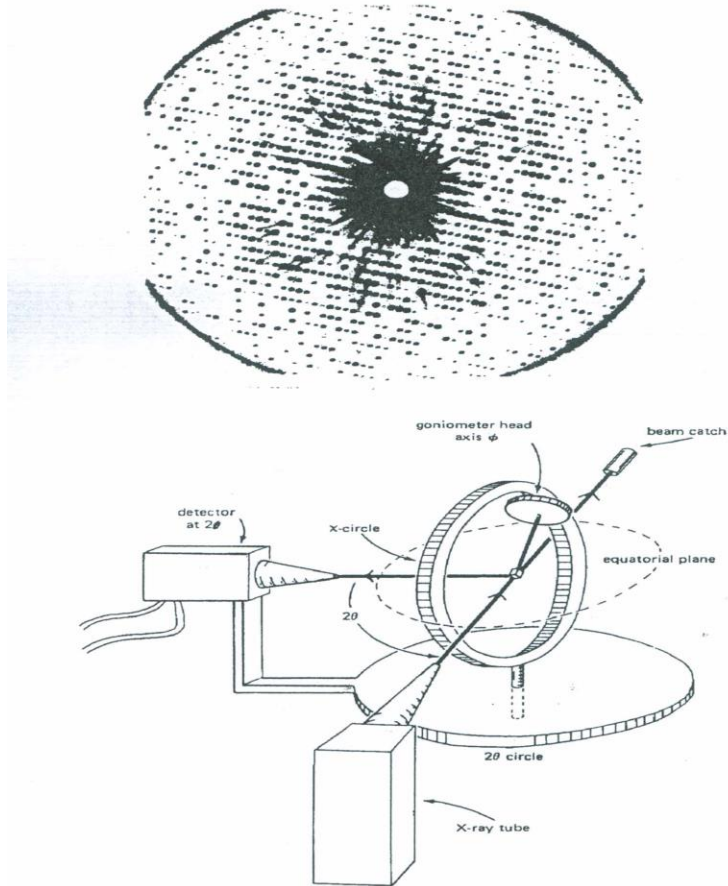
**70°C: farmaco è
sciolto nel polimero
fuso**



Tecniche che si basano sulla Diffrazione dei Raggi X

Single crystal XRD

SINGLE CRYSTAL XRD

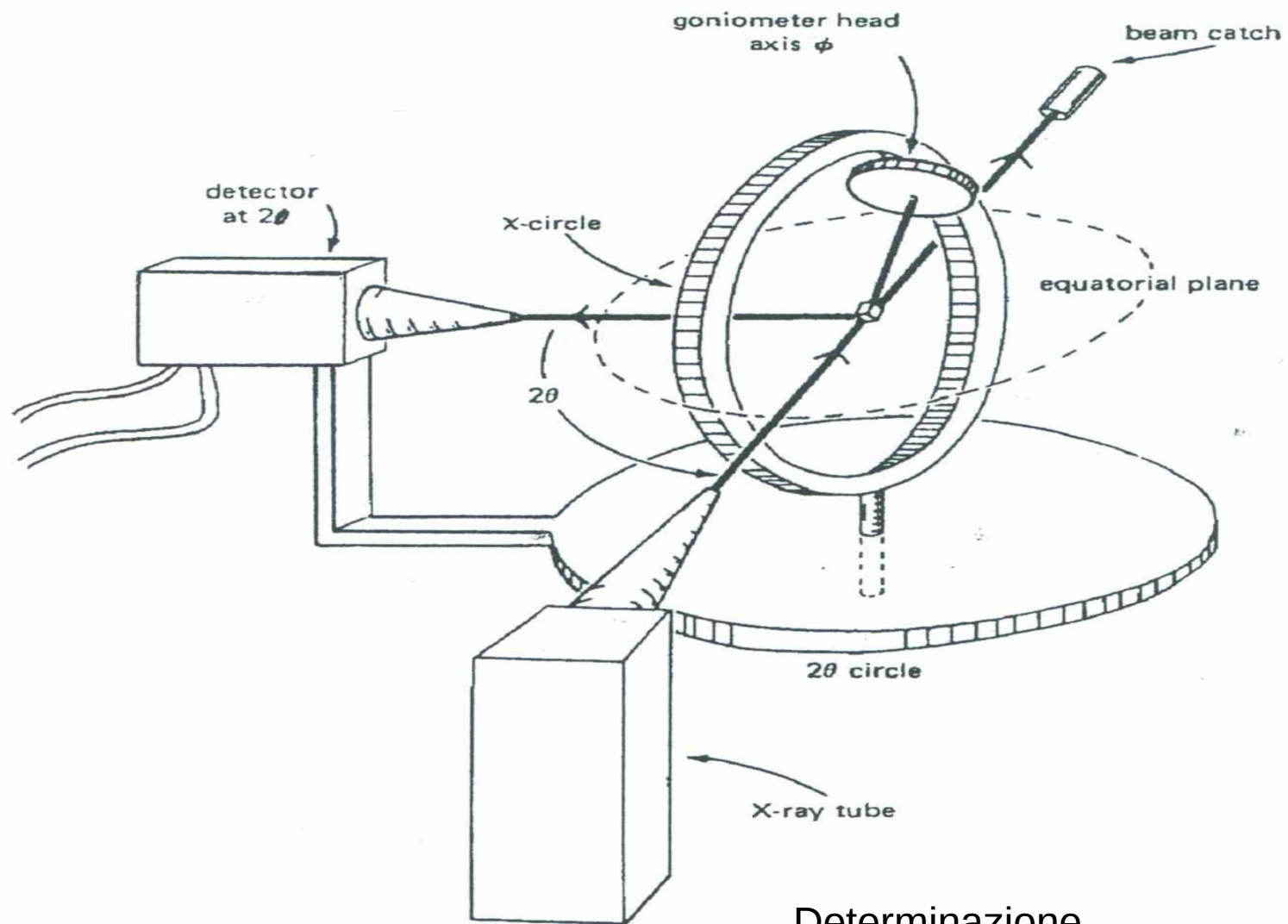


Spettro di **diffrazione** con i raggi X (spettroXRD) ottenuto partendo da un **monocristallo**: ogni solido cristallino è caratterizzato da uno spettro particolare

L'uso principale della diffrazione da cristallo singolo sta nella determinazione

del **peso molecolare** e

della **struttura cristallina del composto**.

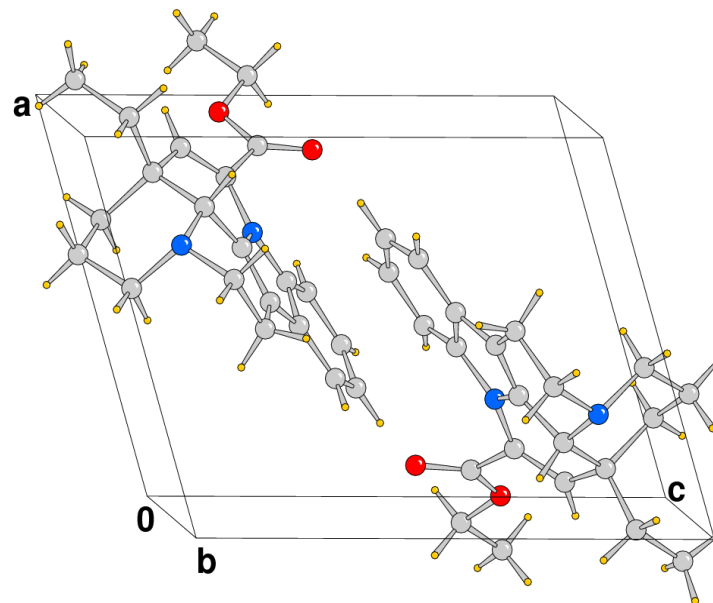


Determinazione
del [peso molecolare](#) e
della [struttura cristallina](#) del composto.

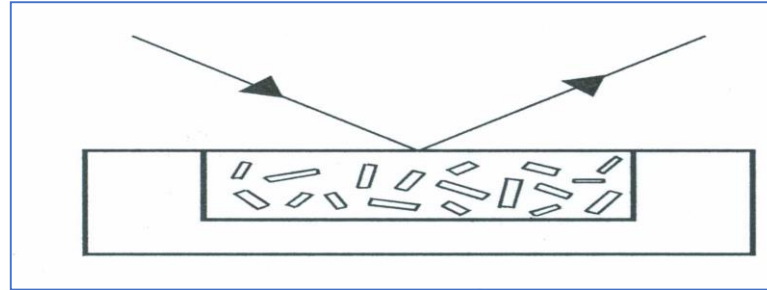
Cella elementare della vinpocetina

(grigio = atomo di carbonio, blu = azoto, rosso = ossigeno)

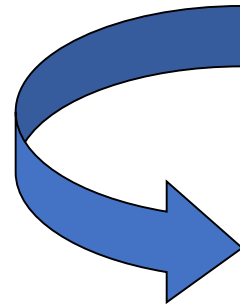
- **Formula** **C₂₂ H₂₆ N₂ O₂**
- **Peso molecolare** **350.45**
- **Temperatura** **293(2) K**
- **Dimensioni della cella unitaria** **$a = 8.907(3) \text{ \AA}$ $\alpha = 90 \text{ deg.}$**
- **(e i corrispettivi angoli)** **$b = 9.530(3) \text{ \AA}$ $\beta = 106.57(3) \text{ deg.}$**
- **$c = 11.286(3) \text{ \AA}$ $\gamma = 90 \text{ deg.}$**
- **Volume** **$918.2(5) \text{ \AA}^3$**



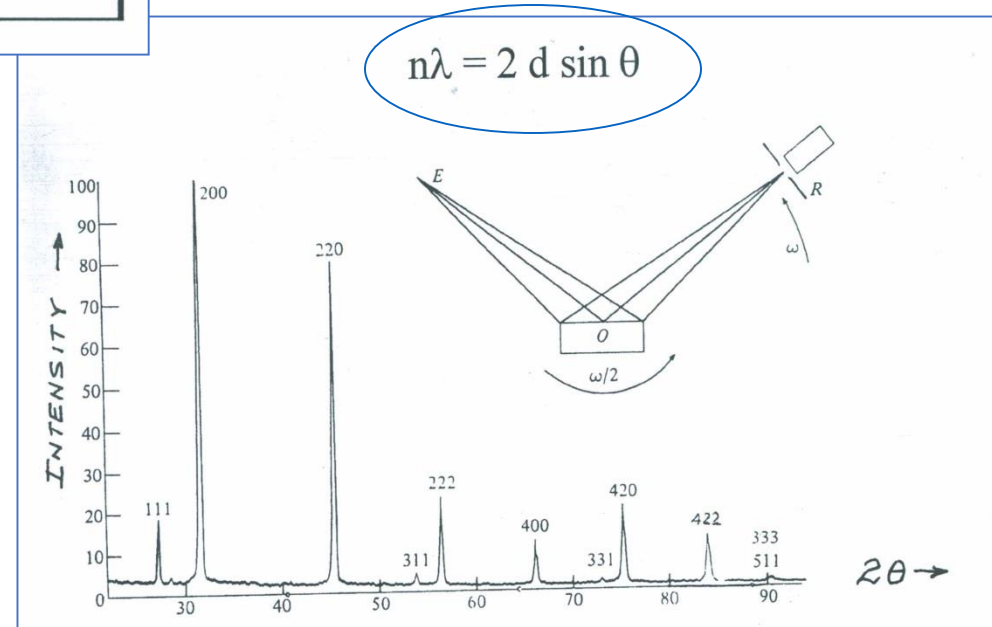
Powder X-ray diffraction (PXRD)



Preparazione
campione

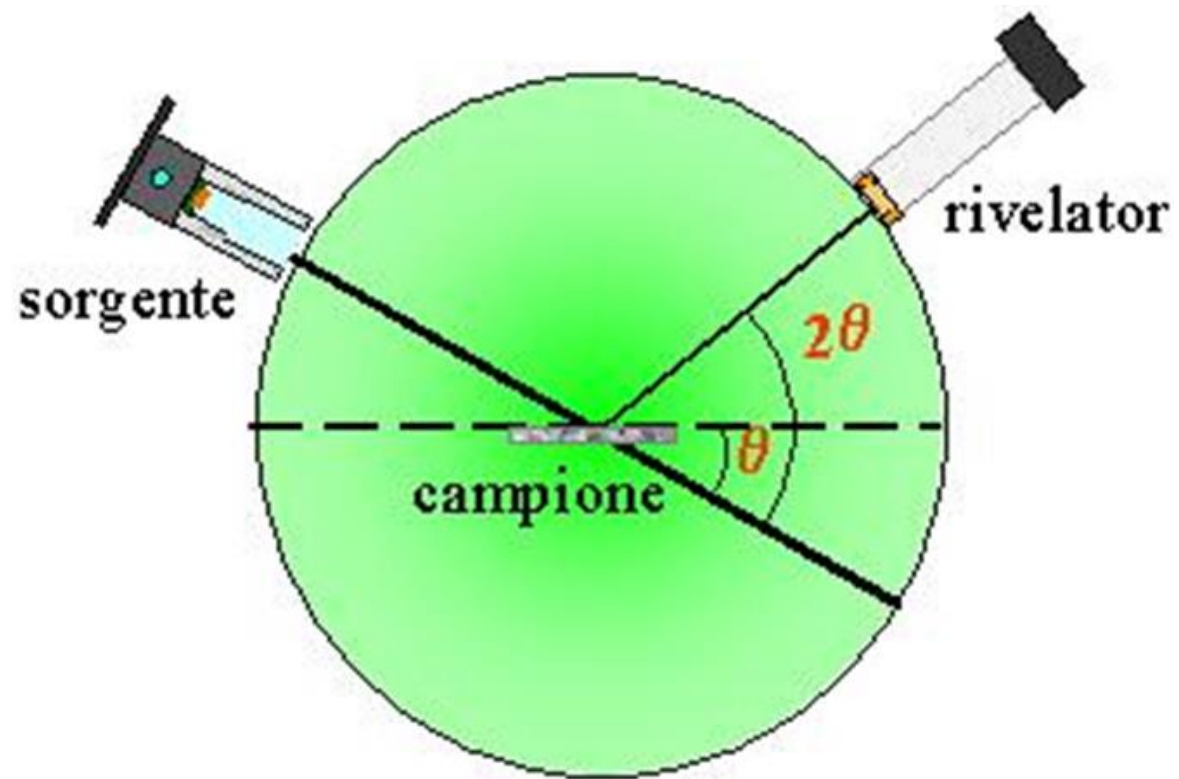


**Più usata in
preformulazione**

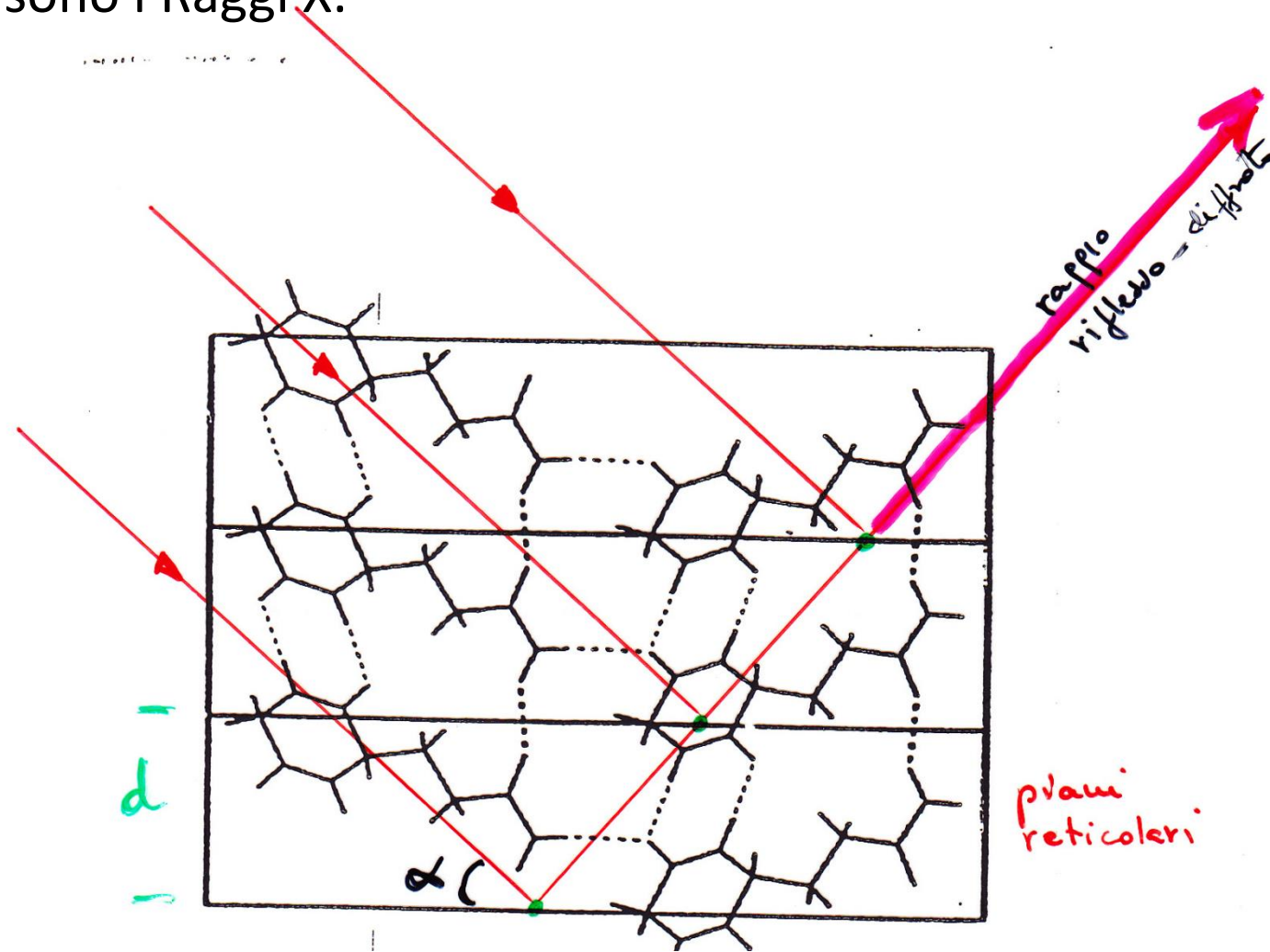


**Si ottiene un pattern unico per
ciascuna struttura cristallina**

Il campione viene irradiato da varie angolazioni



Il reticolo cristallino è un **ottimo reticolo di diffrazione** per radiazioni elettromagnetiche con lunghezze d'onda (**circa $1 \text{ \AA}$**) dell'ordine di grandezza delle distanze tra i filari del reticolo, quali sono i Raggi X.



Perché avviene la diffrazione dei raggi X da campioni cristallini?

Effetti di diffrazione vengono osservati quando i raggi provenienti da piani adiacenti **si sommano costruttivamente**.

La geometria del fenomeno richiede che la differenza di cammino tra raggi riflessi specularmente

da due piani paralleli (che si trovano a distanza d)

sia pari a $2d \sin \theta$.

Il **powder pattern** è tipico perchè

consiste

in una serie di picchi rilevati ai vari angoli di diffrazione (θ)

dai piani (d) del cristallo

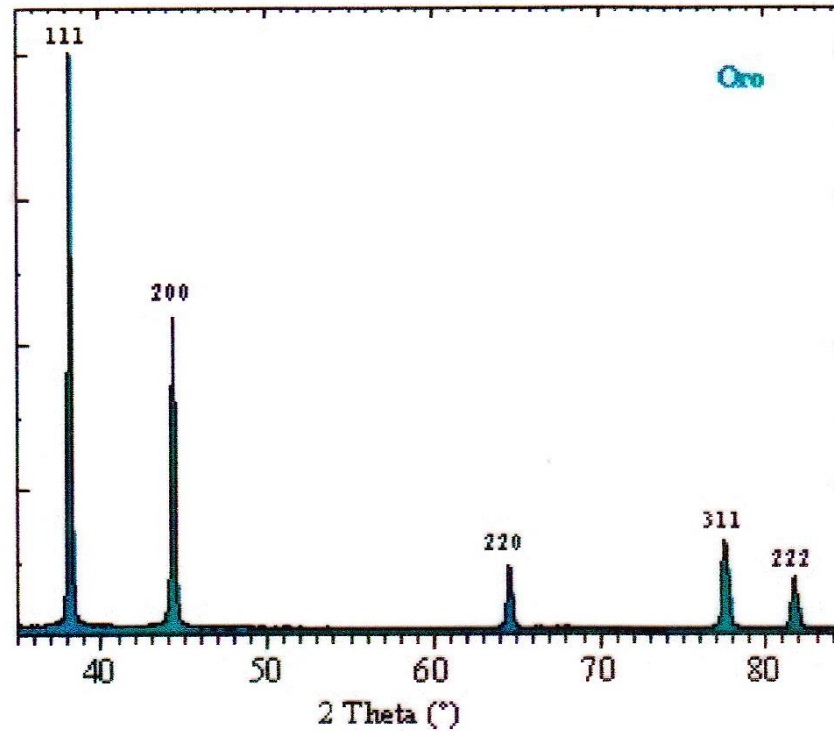
La disposizione nello spazio tridimensionale dei piani di un cristallo è

unica per ogni sostanza

quindi

La diffrazione del raggio da parte dei piani del cristallo darà informazioni sul network del cristallo, sulla disposizione nello spazio delle mlc, ioni o atomi.

intensità

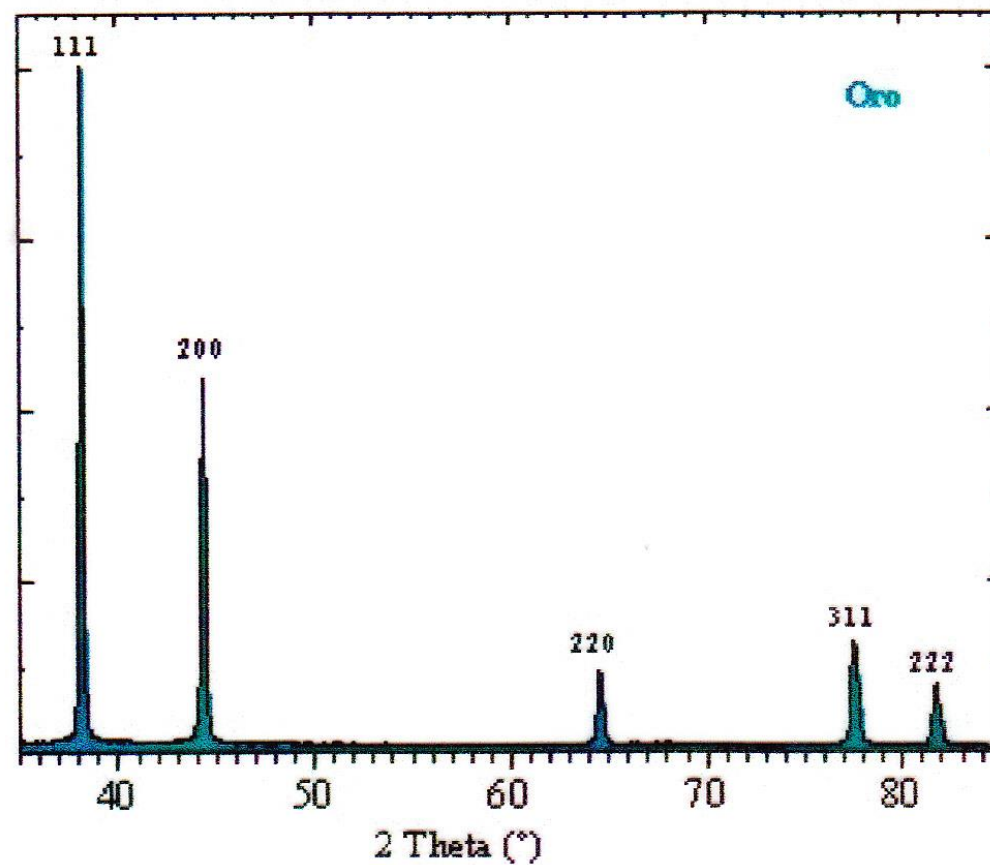


Riportando su di un grafico:

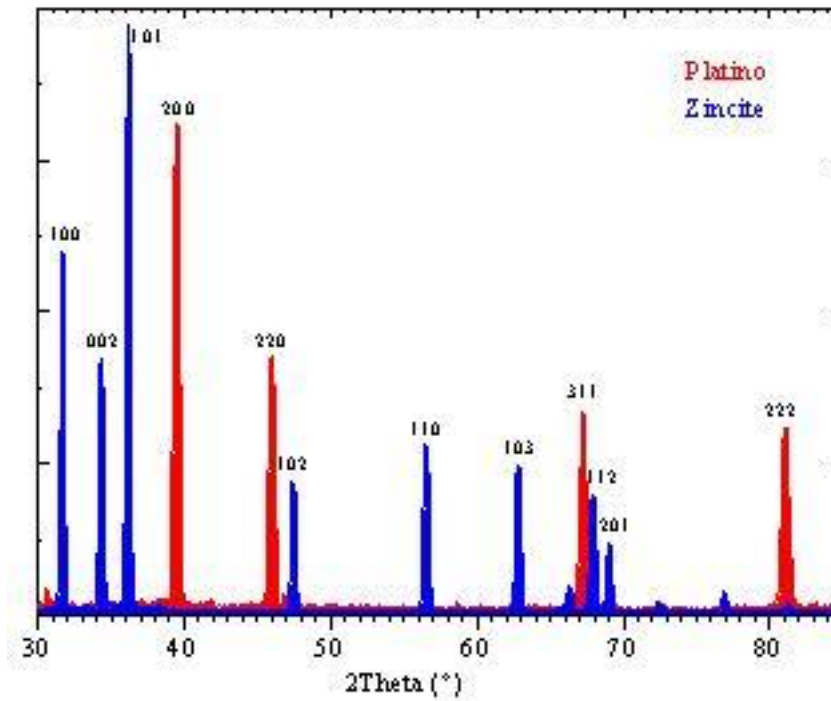
le intensità dei picchi diffratti vs le distanze interplanari d (o 2θ)

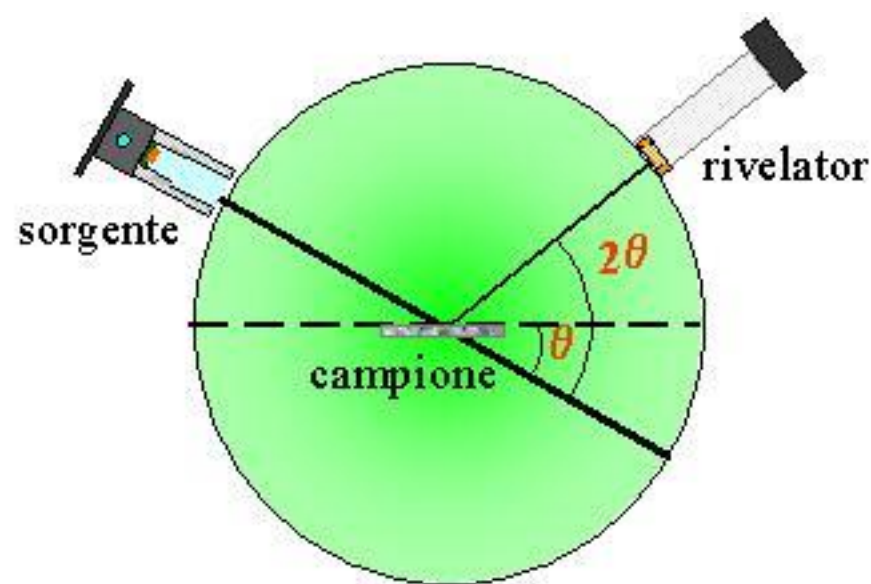
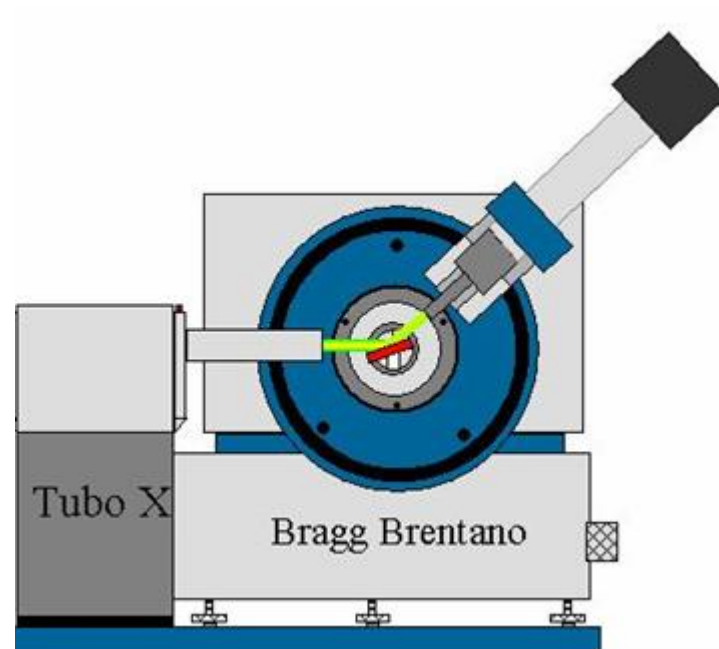
si ottiene uno spettro (*diffattogramma o pattern*) che è caratteristico del campione analizzato.

Sostanza cristallina



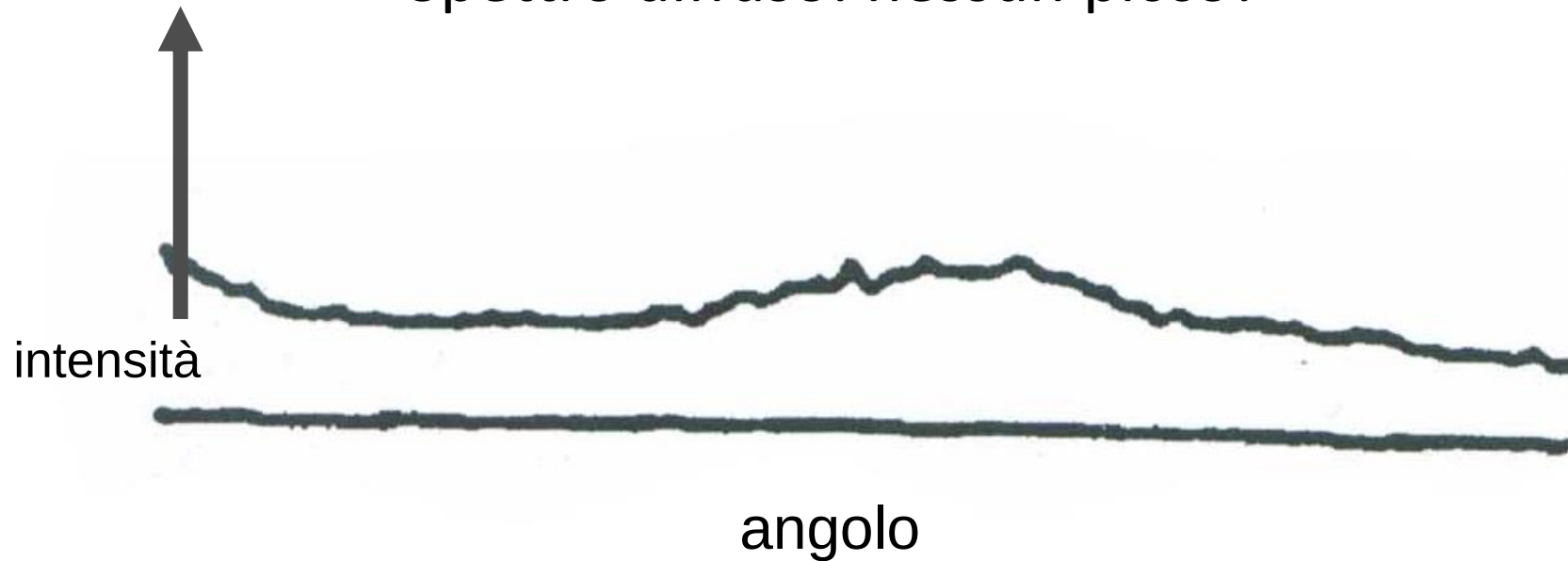
Due sostanze:





Sostanza amorfa?

Non si ha simmetria nel solido:
Il raggio non viene diffratto!
Spettro diffuso: nessun picco!



Principali impieghi della PXRD:

- Cristallino-amorfo
- identificazione del polimorfo o solvato o cocristallo
 - grado di cristallinità
 - Studio di interazioni

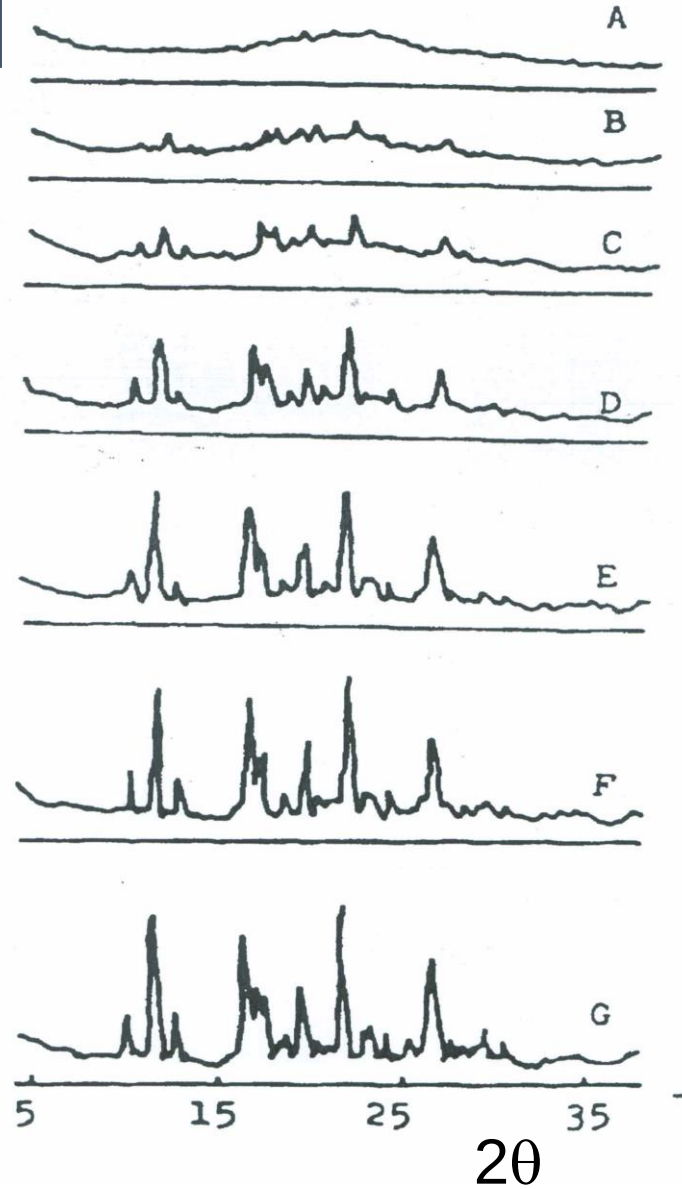
Vantaggi:

- Non distruttiva
- Analisi a freddo

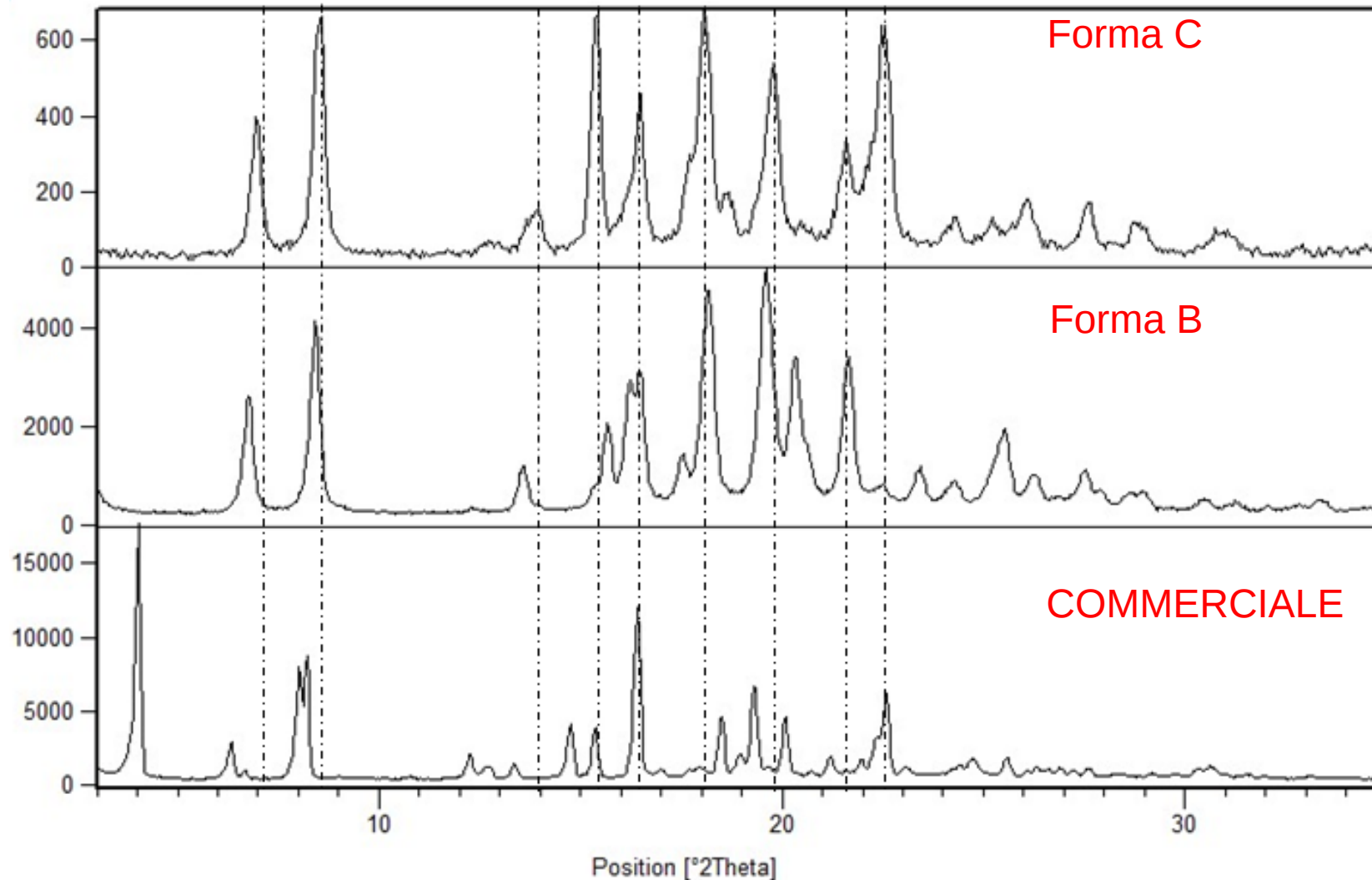
Amorfo->

↑
INTENSITY

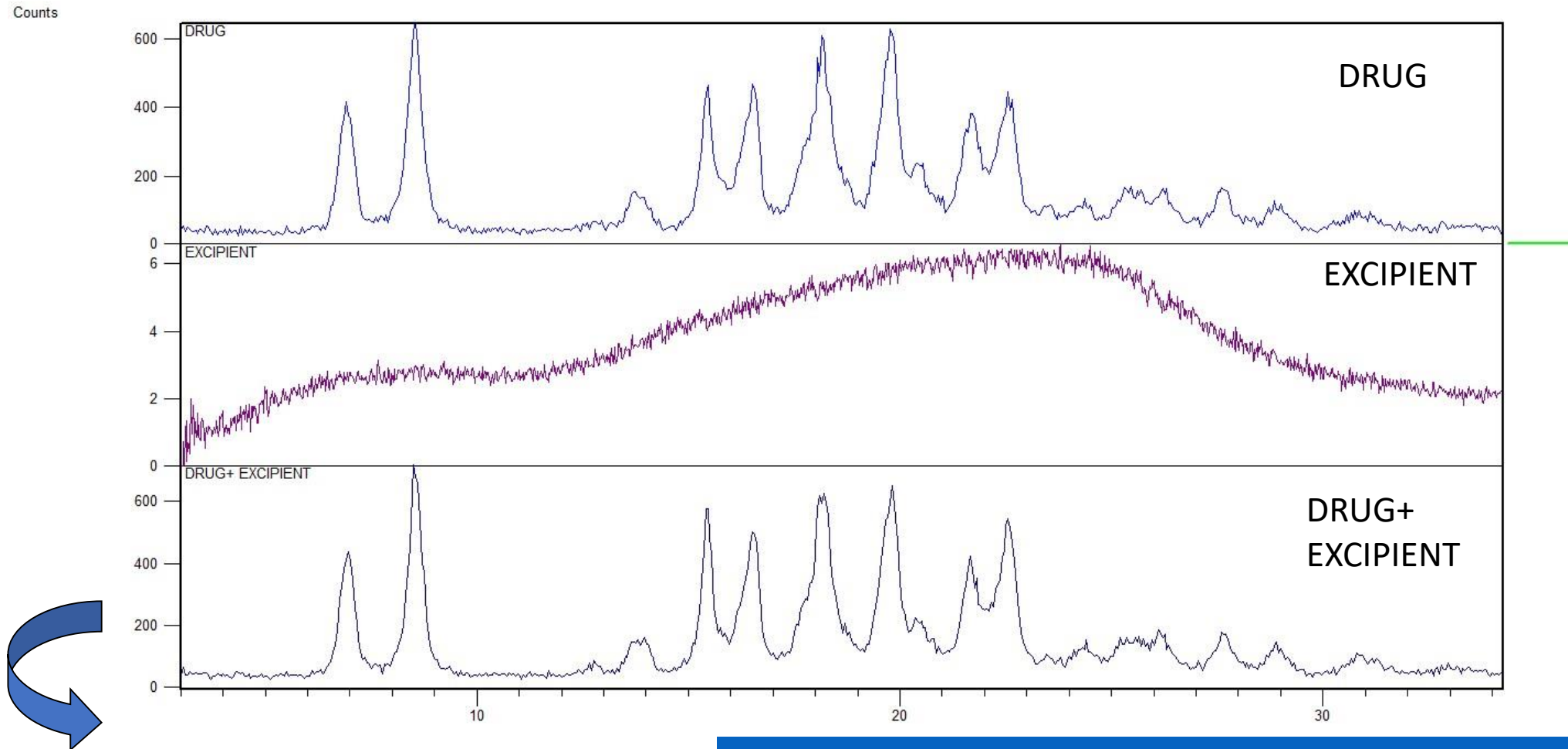
**Elevato grado di
cristallinità->**



Diffrazione ai raggi X di polimorfi anidri del PRAZIQUANTEL (ANTIHELMINTICO)



Compatibilità con eccipiente

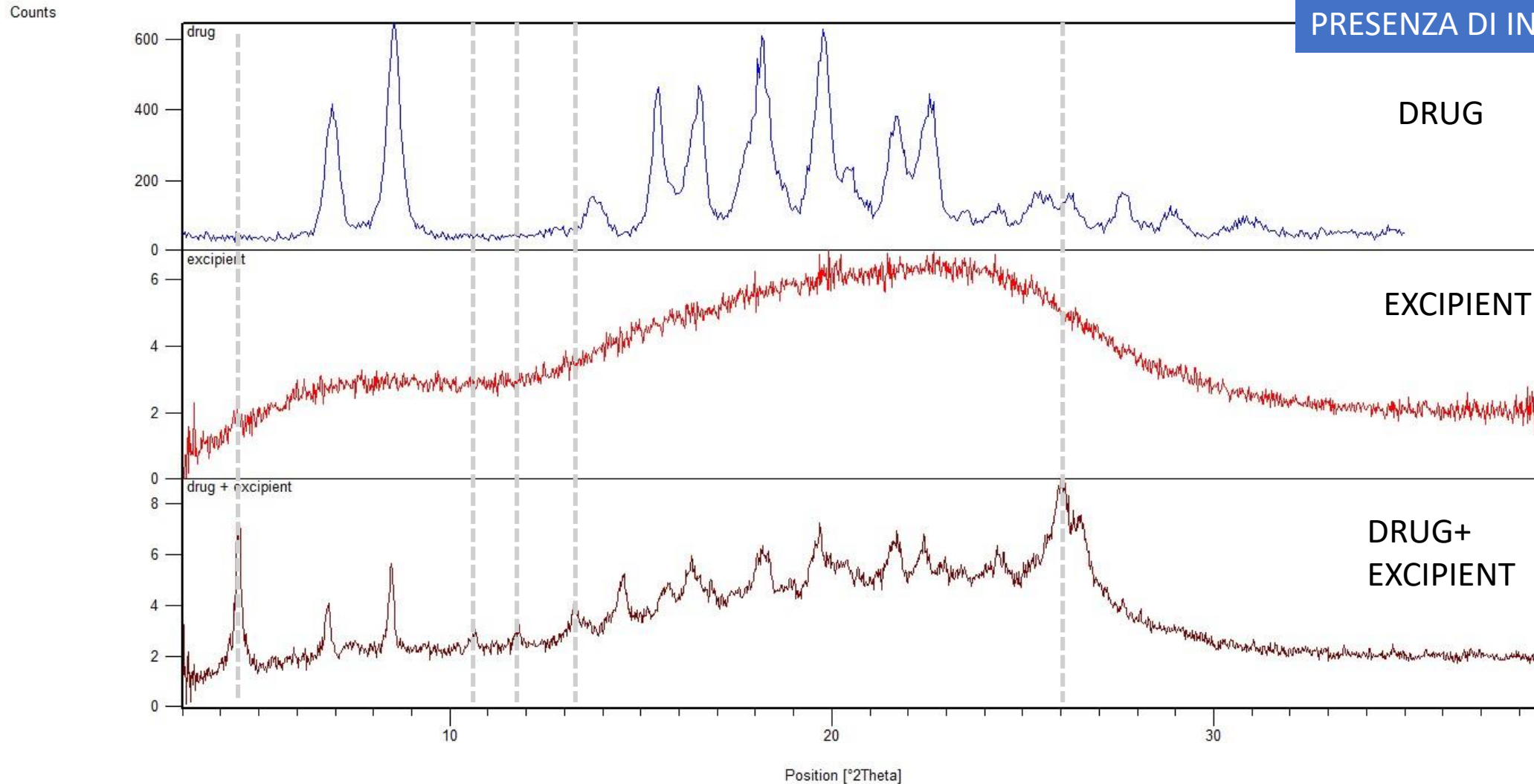


I picchi del Farmaco
rimangono!!!

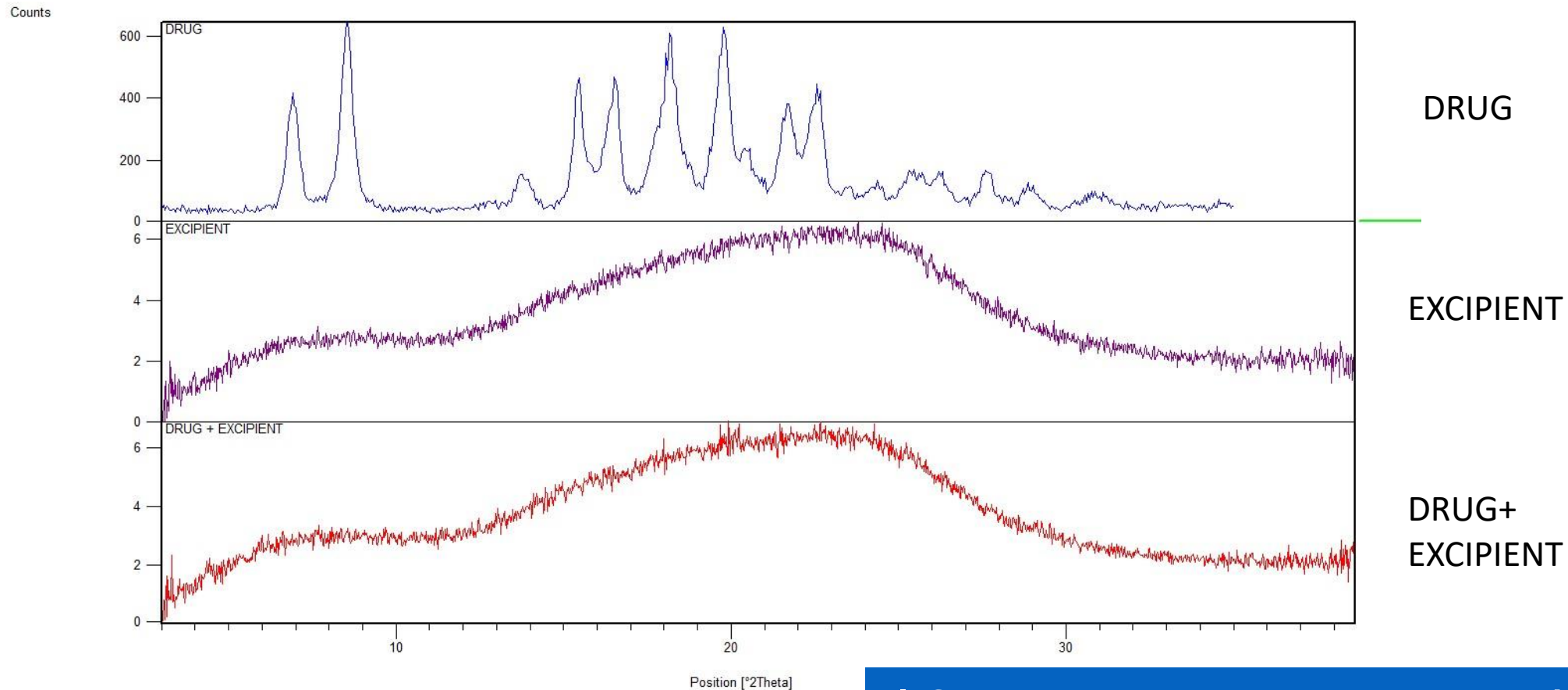
Il farmaco resta uguale in miscela!
NON C'E' INTERAZIONE

Incompatibilità con eccipiente

Nella miscela ci sono nuovi segnali
Nuova fase solida
PRESENZA DI INTERAZIONI

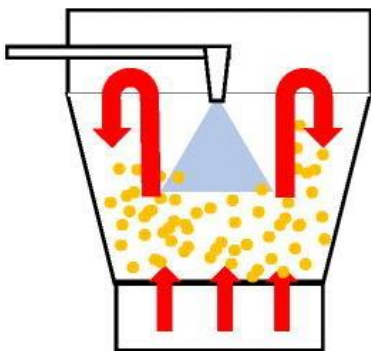


Incompatibilità con eccipiente

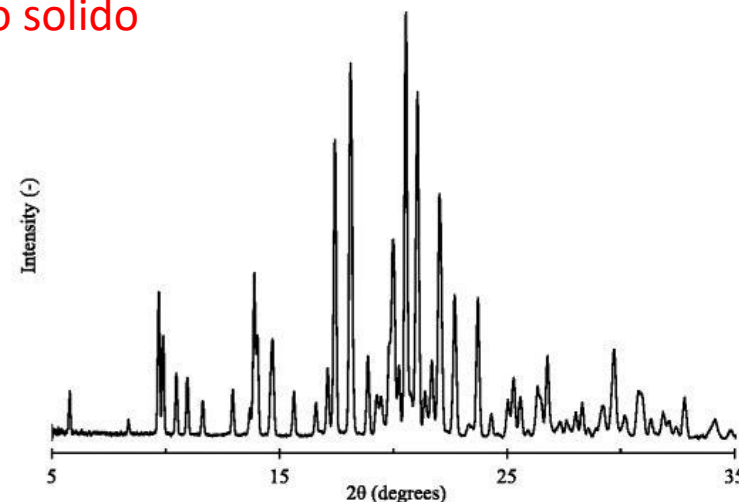
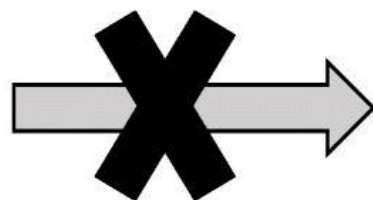


**Il farmaco reso AMORFO in miscela!
C'E' INTERAZIONE!**

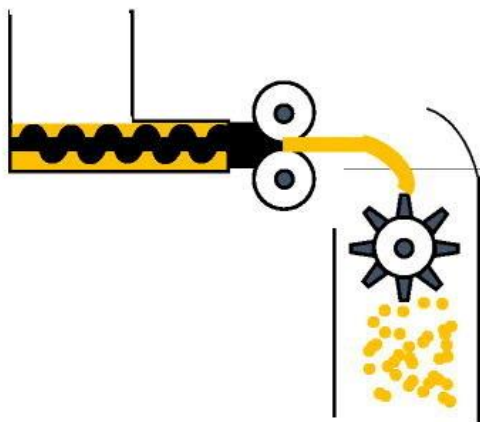
IMATINIB MESILATO: con l'analisi a raggi X su polveri si capisce quale processo è più adatto per realizzare una forma di dosaggio senza cambiarne lo stato solido



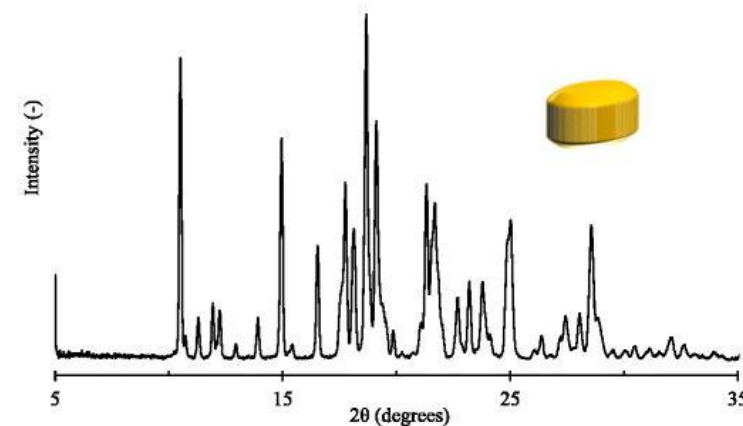
Fluidized-bed granulation



Transition from α -form to the β -form crystal



Dry compression granulation



Maintain of α - form crystals in tablet

Quindi..

- Il Farmaco interagisce con l'eccipiente se la miscela **NON** è la somma dei segnali del farmaco e dell'eccipiente
- (e ce ne sono di nuovi o ne spariscono!)

Altre tecniche

Spettroscopia Infrarosso- Raman:

entrambe permettono di indagare sulle *vibrazioni* delle molecole costituenti un materiale
Entrambe a freddo.

FTIR/Raman complementari

FTIR

- Sensibile verso legami polari
- Vibrazioni di gruppi funzionali etero nucleari

Raman

- Cambio nella polarizzabilità della mlc
- Sensibile verso legami molecolari omonucleari
- Distingue tra: C-C, C=C,...

APPLICAZIONI

- distinguere polimorfi (quali sono i gruppi coinvolti nella diversa conformazione o disposizione delle mlc),
- riconoscere forme idrate (conversione forme anidre/idrate- band shifts indicano structural changes...),
- interazioni allo stato solido (riconosco gruppi coinvolti...)
- Amorfismo (i segnali sono più ampi e meno affilati)

Interazioni (FTIR)

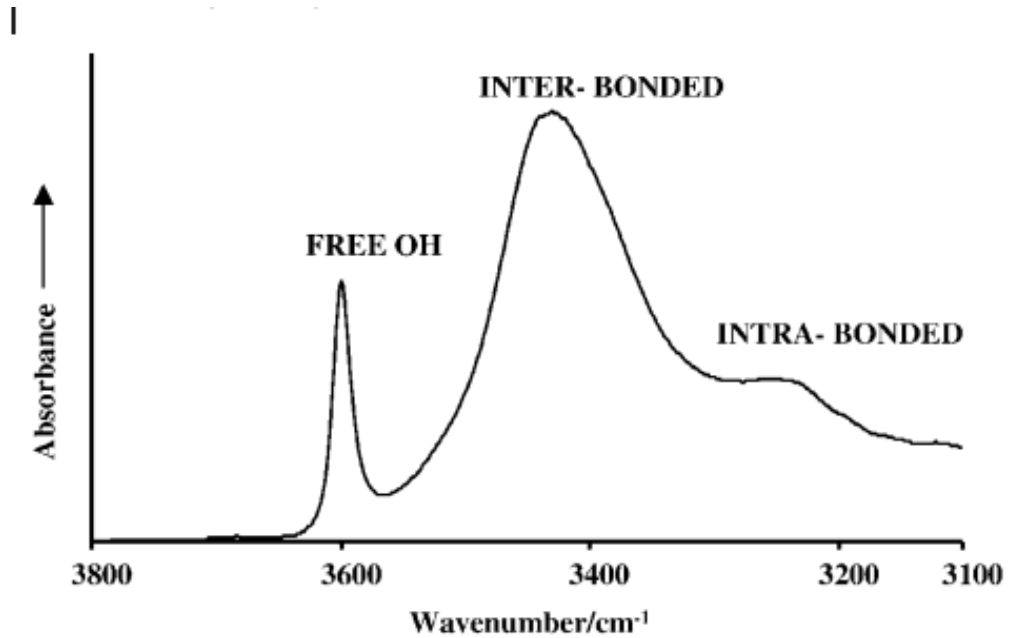
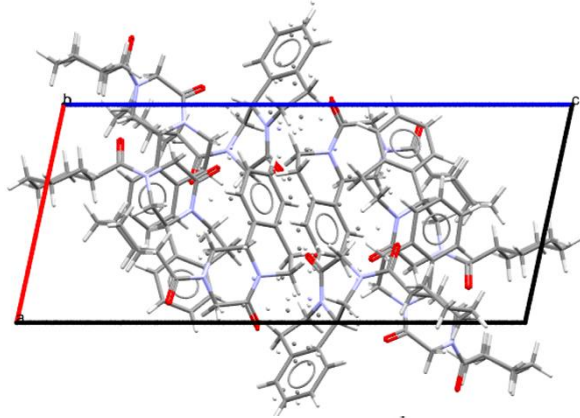


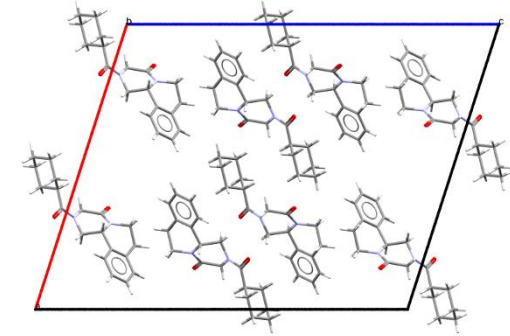
Fig. 5.7 Free, inter- and intramolecular hydrogen bond OH bands. (Copyright

Diversi polimorfi anidri distinguibili con FTIR

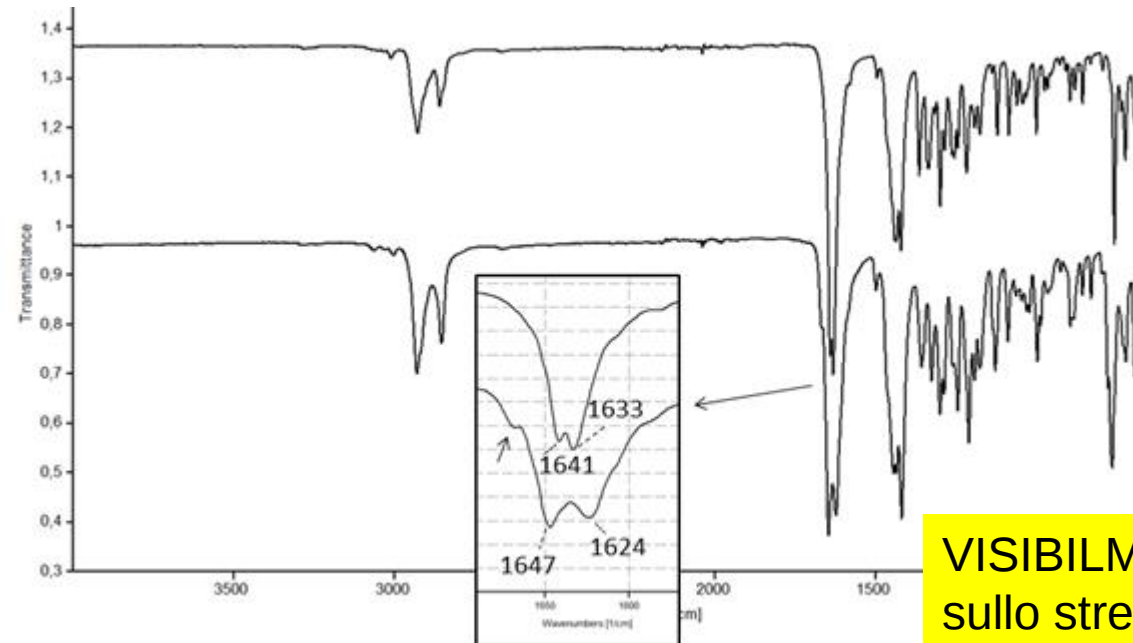


SYN

FTIR



ANTI



VISIBILMENTE DIVERSI
sullo stretching
del carbonile

NIR: Formazione di cocristalli

(interazione con legami idrogeno tra coformeri)

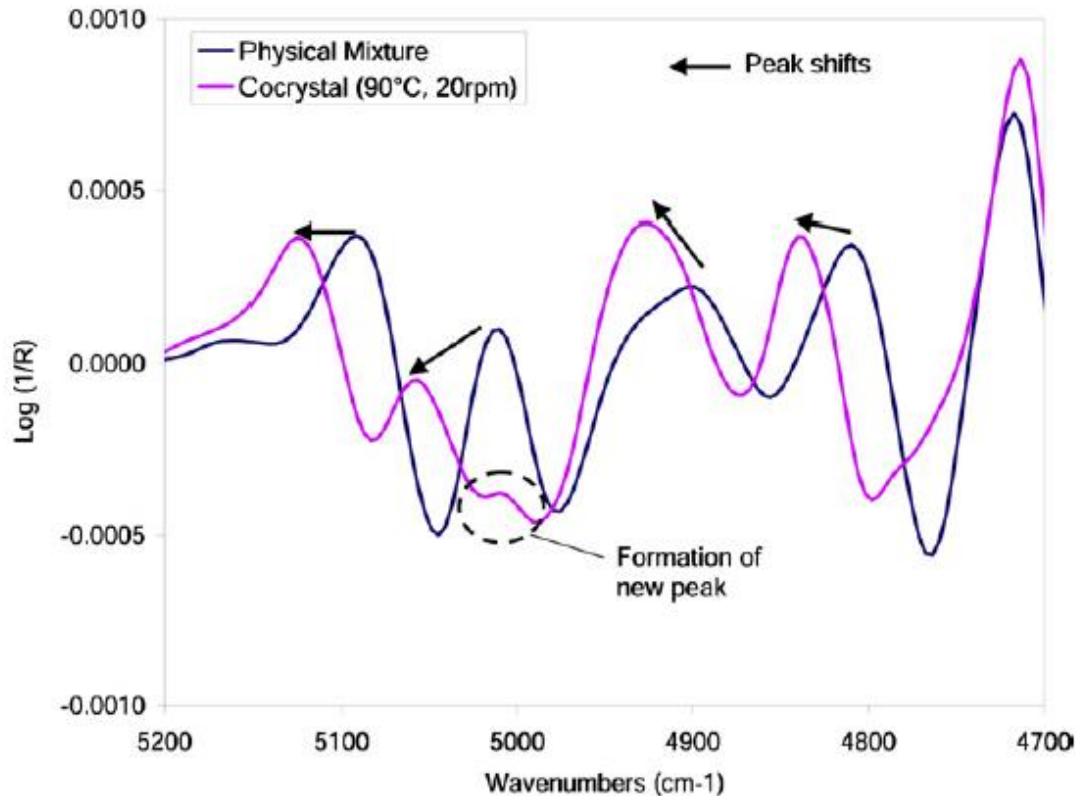


Fig. 6. Second derivative of NIR spectra between 4700 and 5200 wave-numbers; physical mixture and extruded cocrystal.

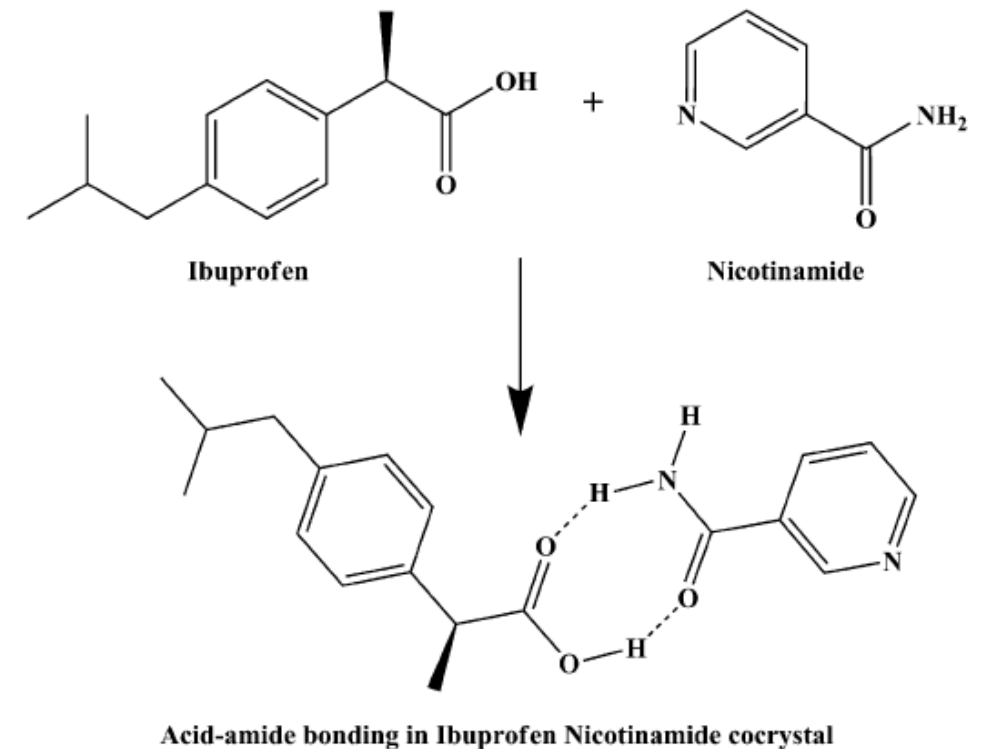
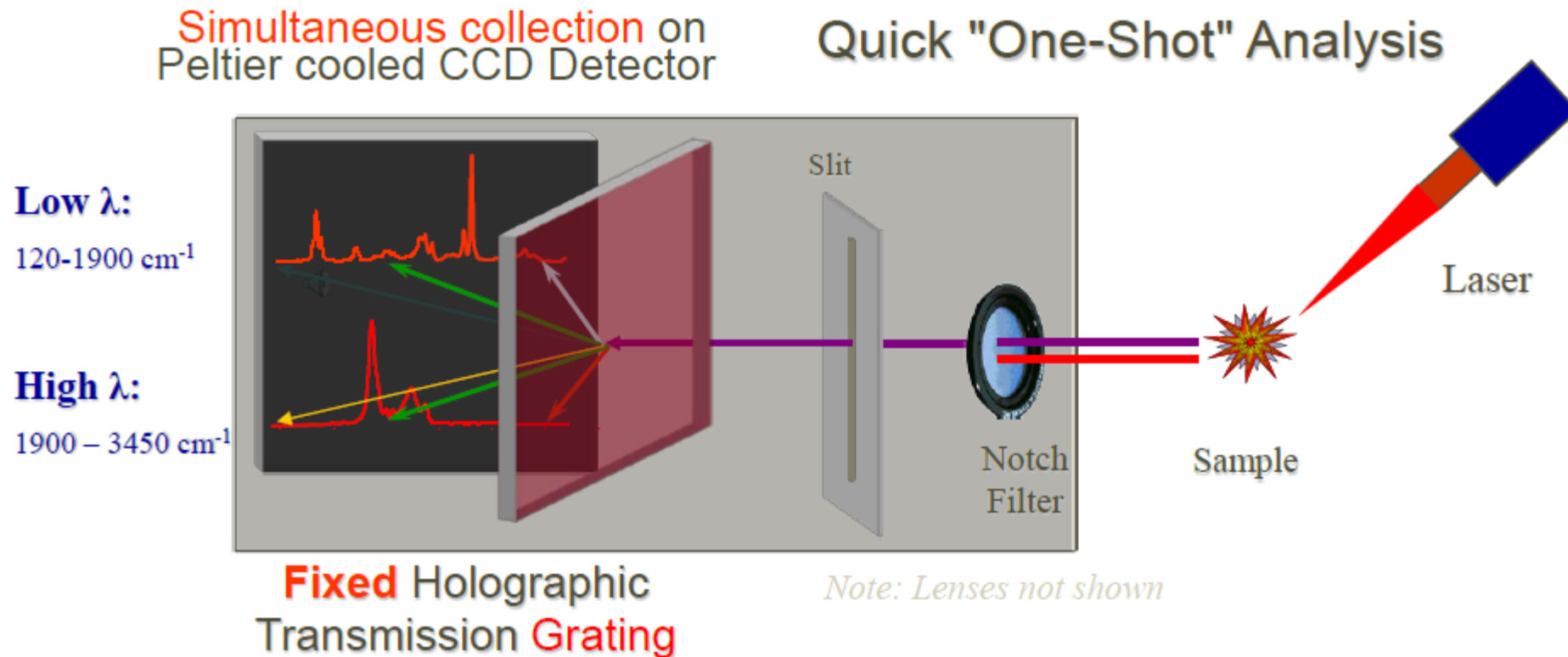


Fig. 7. Chemical structure of ibuprofen and nicotinamide; and typical cocrystal bonding.

- Second derivatives of the physical mixture with cocrystal. Cocrystals showed significant differences to the physical mixture.
- These changes in the spectrum could be attributed to the hydrogen bonding involved in cocrystal formation between ibuprofen and nicotinamide.

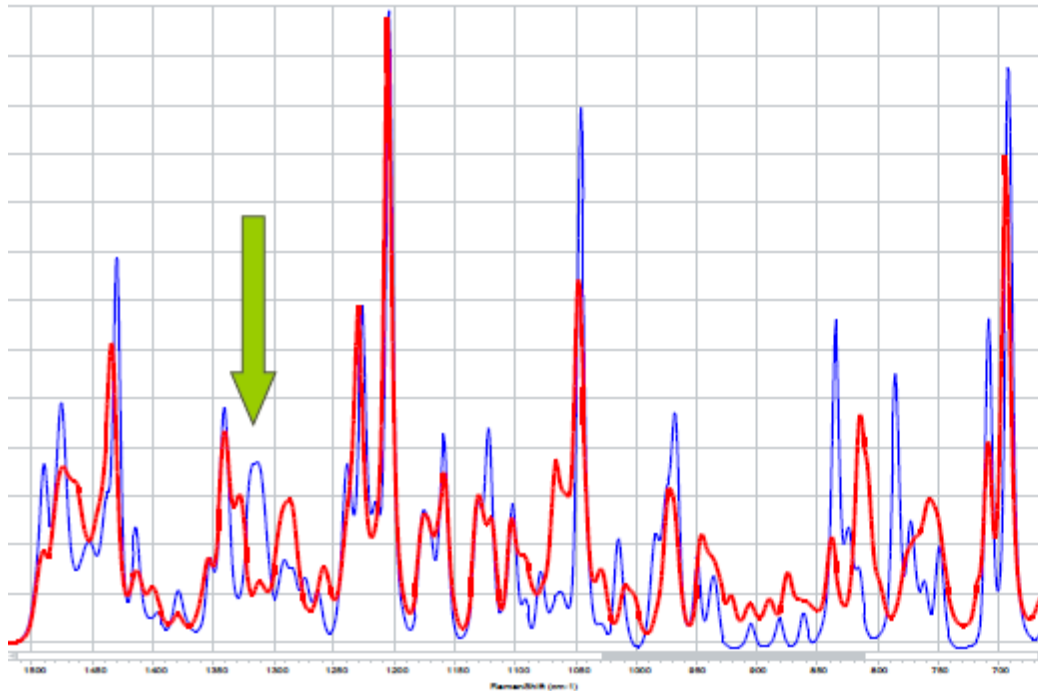
How does a Raman spectrometer work? ^{Lundbeck}



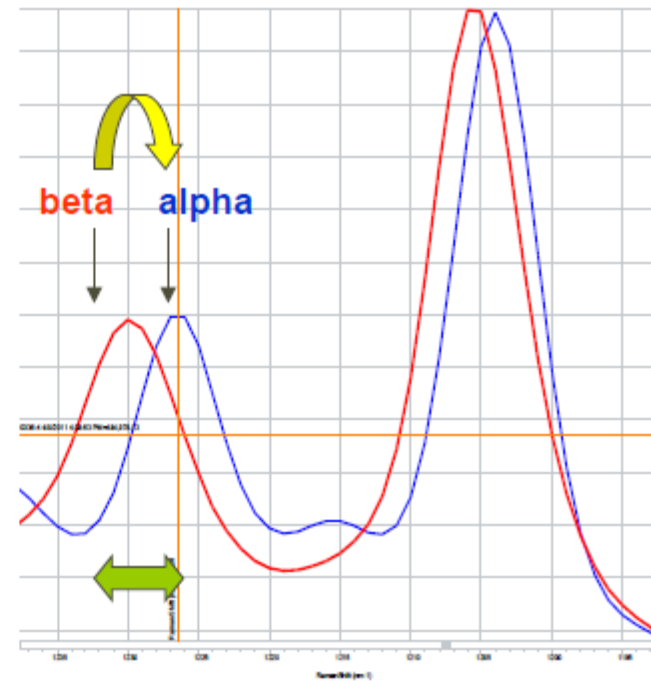
Comparison **alpha** vs. **beta** polymorph



se usato in continuous manufacturing:
con il Raman monitoro in-process le trasformazioni



Spectrum of solid in-process sample
(**beta form in red**) vs. solid API lot (**alpha form in blue**)

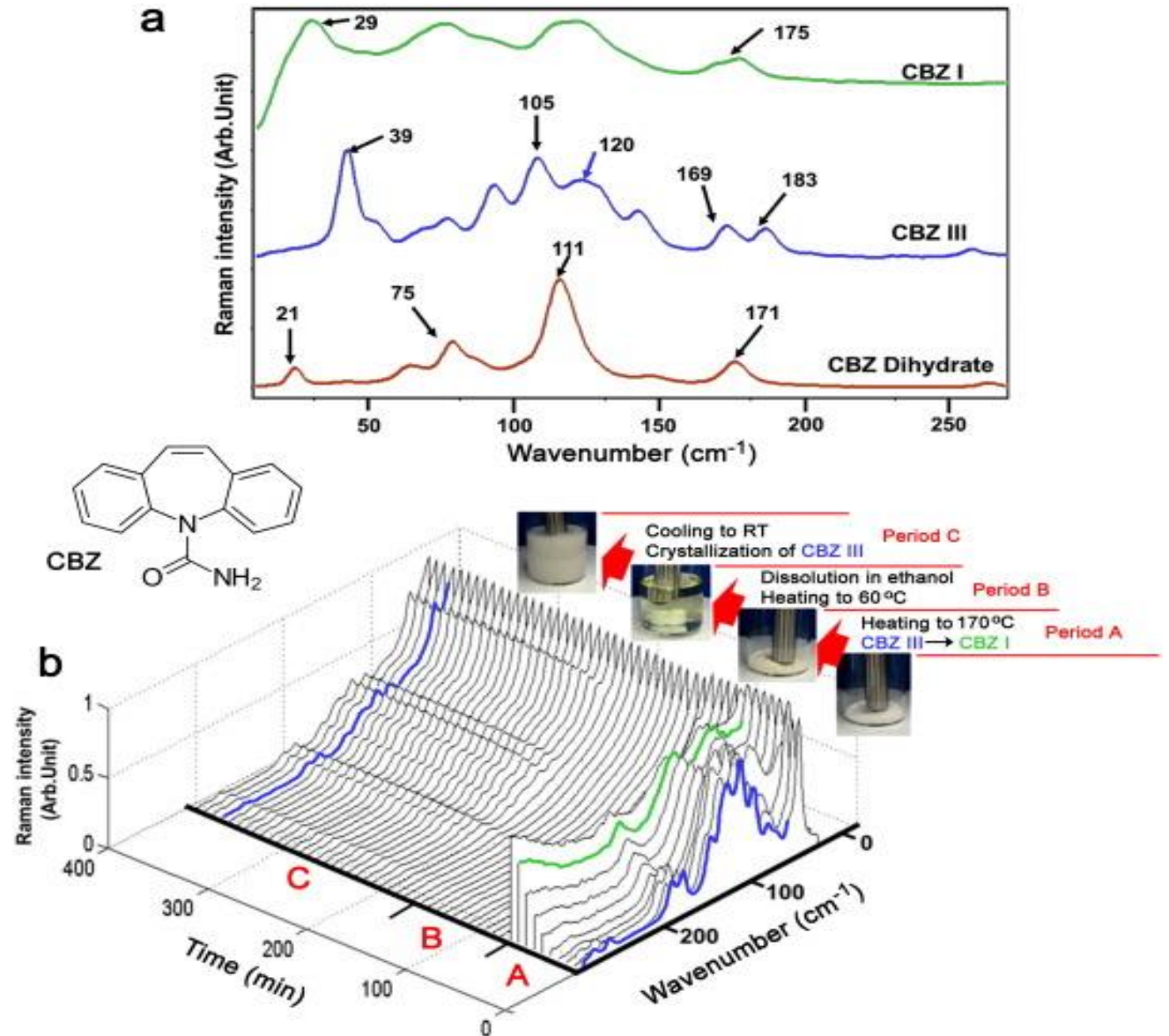


Also a very small shift in Raman
wave numbers (3-4 cm⁻¹)
distinguishes the two forms.

Distinguo con il Raman diversi polimorfi e idrati

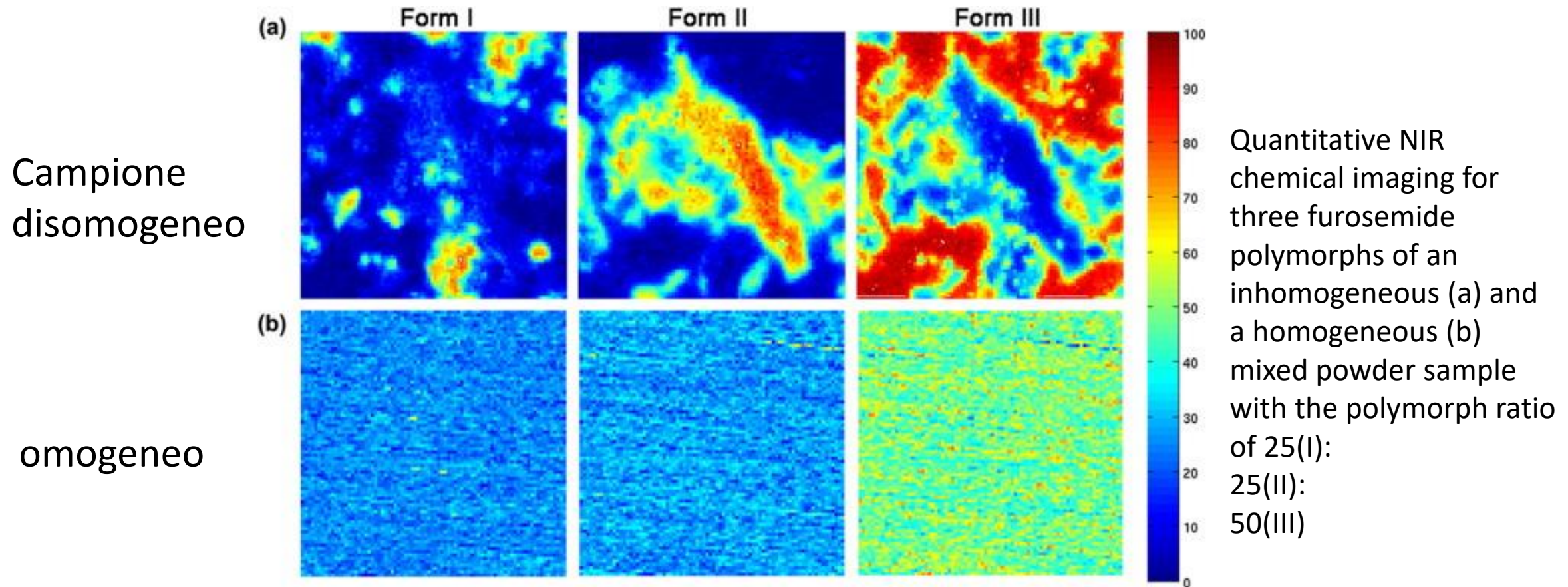
Carbamazepina (CBZ)

se usato in continuous manufacturing:
con il Raman monitoro in-process le
trasformazioni



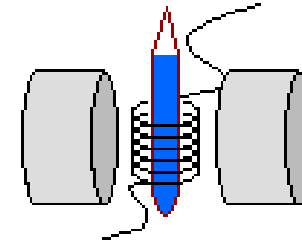
Quantitative **NIR chemical imaging (NIR-CI)** of polymorphs is feasible under appropriate **multivariate data analysis**.

Es. each of three furosemide crystal forms can be **mapped separately** and the NIR-CI gives reliable **distribution and concentration of the crystal forms**.



NMR

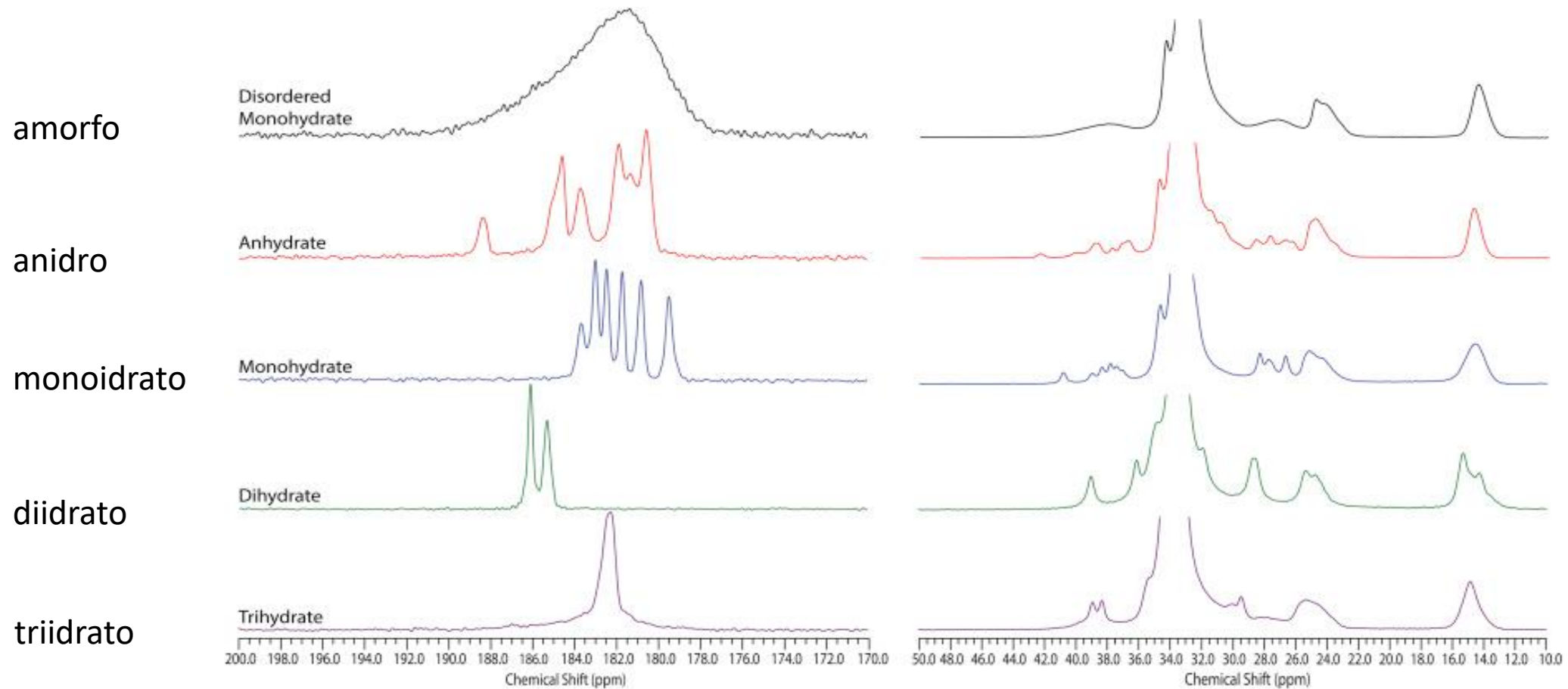
Sia in soluzione che allo stato solido
Sia del ^{13}C , che del protone o ^{15}N ...
grazie al **chemical shift** :



PRINCIPALI APPLICAZIONI:

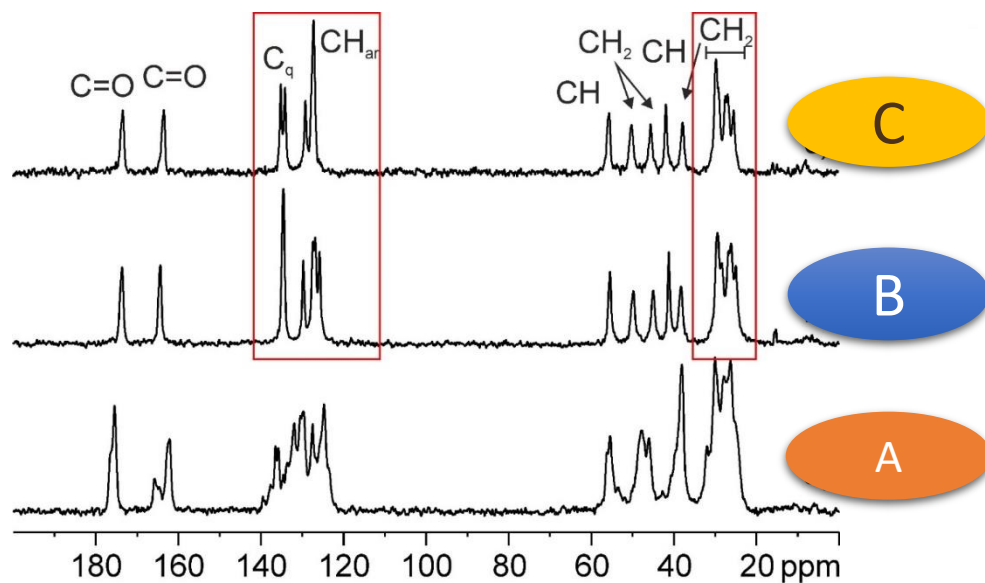
- POLIMORFI, solvati e idrati (i nuclei non sono magneticamente equivalenti)
- Amorfo (i solidi amorfi hanno picchi molto larghi «broadening» perché non risuonano tutti allo stesso campo come nei cristalli)
- Interazioni: cambia intorno chimico per effetto delle interazioni (legami idrogeno, formazione di sali,...)

Anidri/idrati amorfì vs cristallini

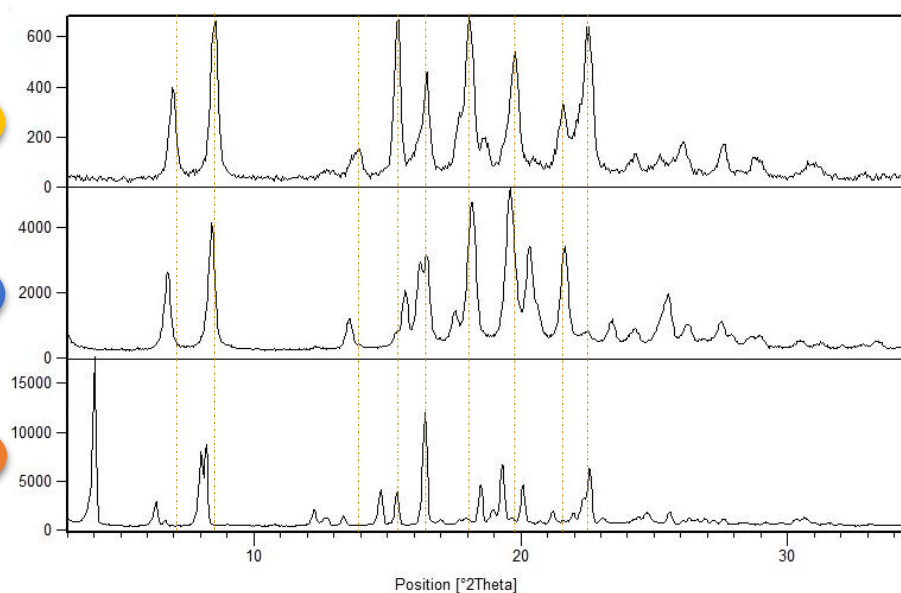


diversi polimorfi della stessa sostanza

SS-NMR ^{13}C



PXRD

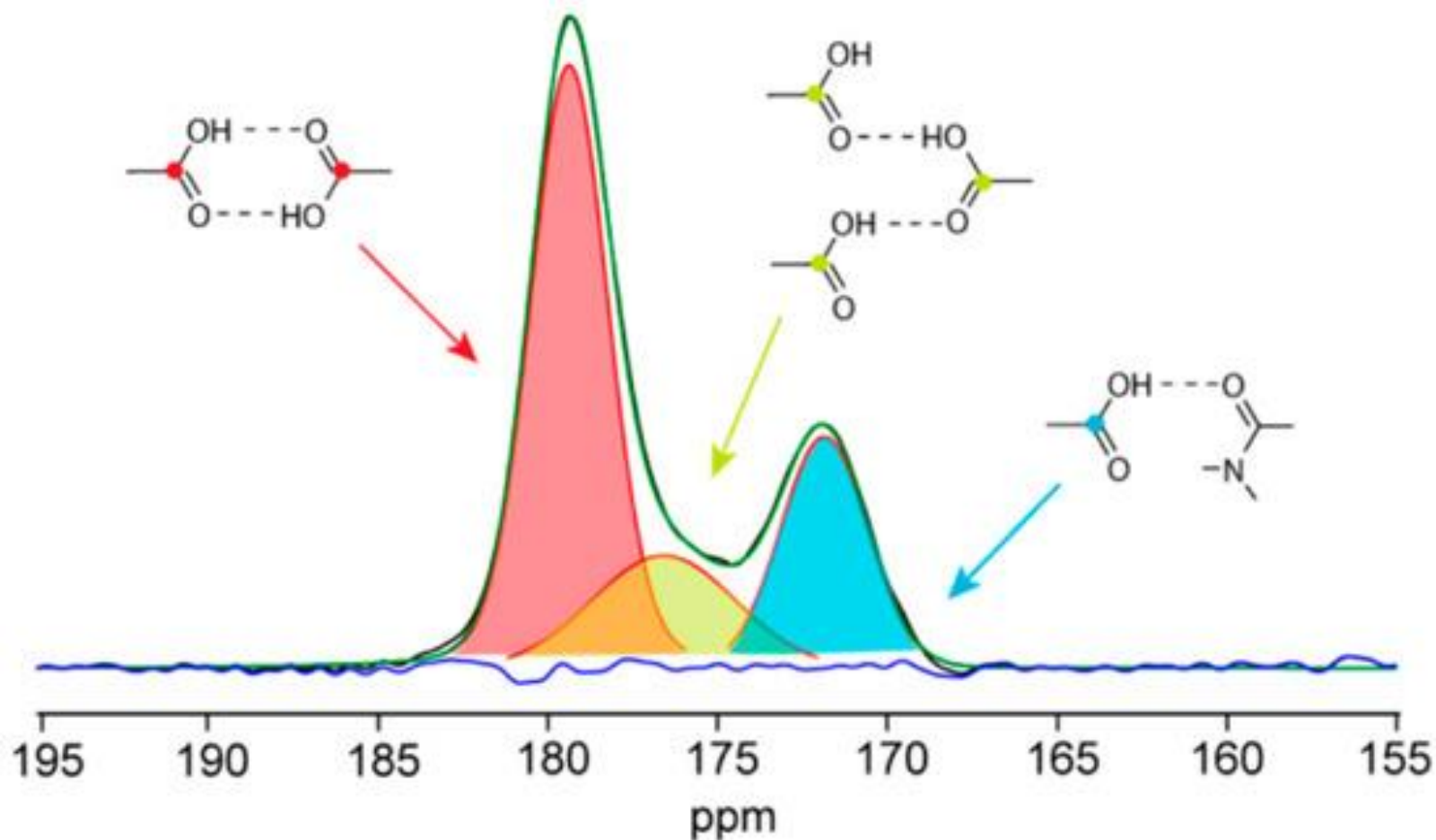


D. Zanolla, B. Perissutti, P., Cerreia Vioglio, M.R. Chierotti, L. Gigli, N. Demitri, N. Passerini, B. Albertini, E. Franceschinis, J. Keiser, D. Voinovich D. A new **praziquantel** polymorph discovered by means of a DoE approach: crystal structure solution from Synchrotron XRPD and characterization --submitted manuscript --

INTERAZIONI (per es. legami H in un cocristallo)

CPMAS ^{13}C spectrum of the carboxylic acid of indomethacin:

peaks are shown in red, yellow, and blue to illustrate the **various hydrogen bonds**.



overview

A summary of spectroscopic techniques used in pharmaceutical science.

Analytical techniques	Information	Advantages	Disadvantages	Time Efficiency
Fourier Transform IR	Interaction between drugs and polymers Molecular motions Polymorph characterization Identification of amorphous and crystalline phases Phase separation	Small sample size Nondestructive Easy to use Simple sample preparation	Effects of moisture	In seconds
Near IR	Molecular structure Structural motions Polymorphs selection	Small sample size Easy to use Simple sample preparation	Weak intensity Lower signal to noise ratio	In seconds
Raman	Interaction between drugs and polymers Phase separation Miscibility by mapping	Small sample size Certain penetration of glass containers Insensitive to water	Higher energy laser may damage samples Sample fluorescence Photodegradation	In seconds
Solid-state NMR	Amorphous identification Relaxation time Molecular mobility Crystallinity Miscibility Interaction between drugs and polymers	Small sample size Simple sample preparation	Expensive	In hours to days

Scanning electron microscope

Si usa per studiare la morfologia delle particelle $\Rightarrow$ **HABITUS**

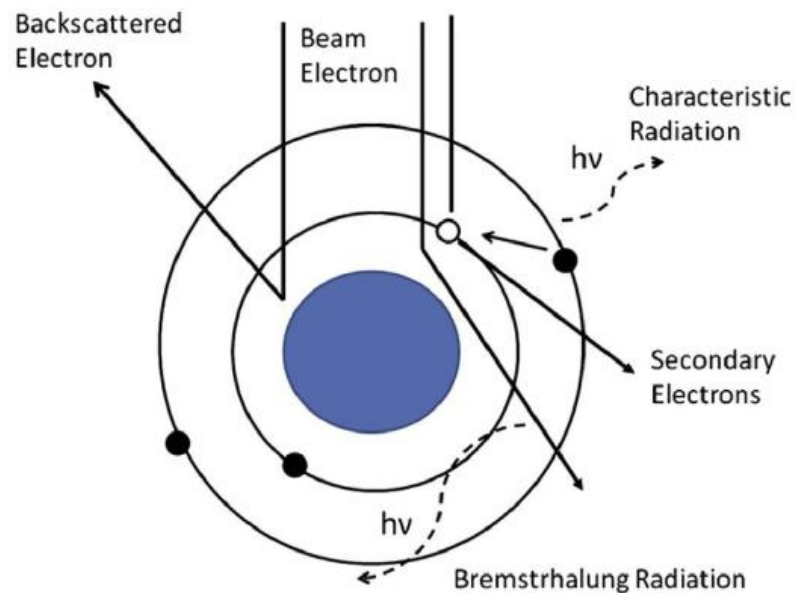
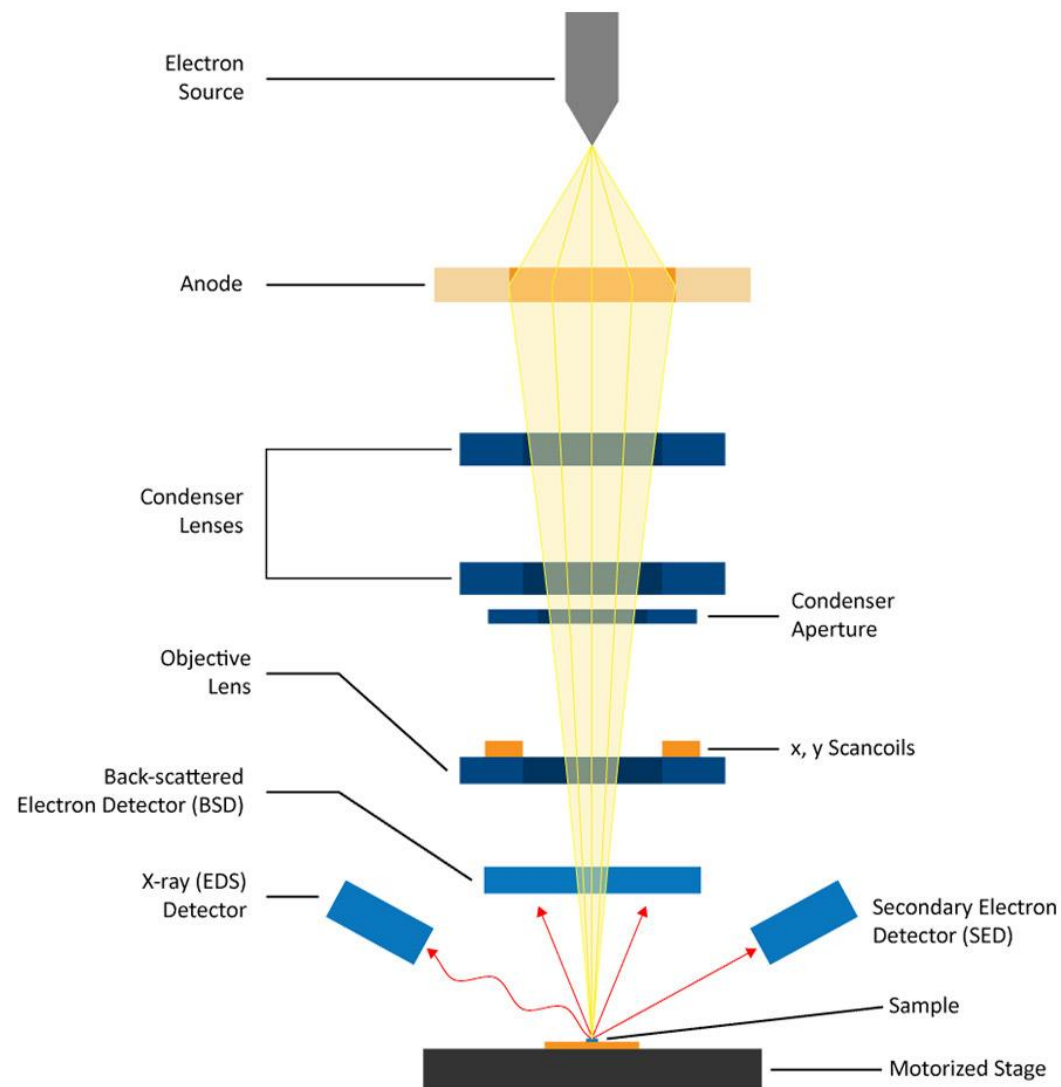


Fig. 1. Elastic and inelastic interactions between electrons and an atom (Adapted with permission [73]).

Elettrone secondario produce
immagini ad alta risoluzione

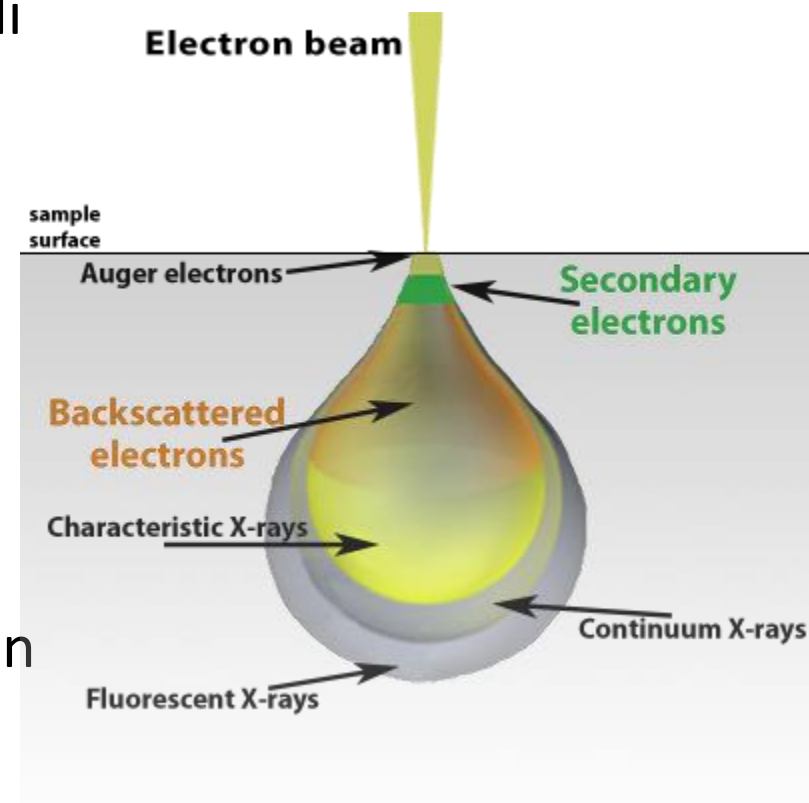


- E' equipaggiato di un microscopio a luce invertita, e consiste di un **generatore di elettroni** di solito filamento di tungsteno (illuminazione), una colonna con una serie di lenti che focalizzano il raggio, la camera del campione, e un detector.
- Il campione-in genere non conduce-viene rivestito con un materiale che conduce (**Au o Pd**).
- **Vuoto spinto** nella camera
- Interazione con il campione: **emissione dell'elettrone secondario dell'analita** (bassa energia) che migra lentamente in direzione del detector risentendo della topografia del campione

“scansione”

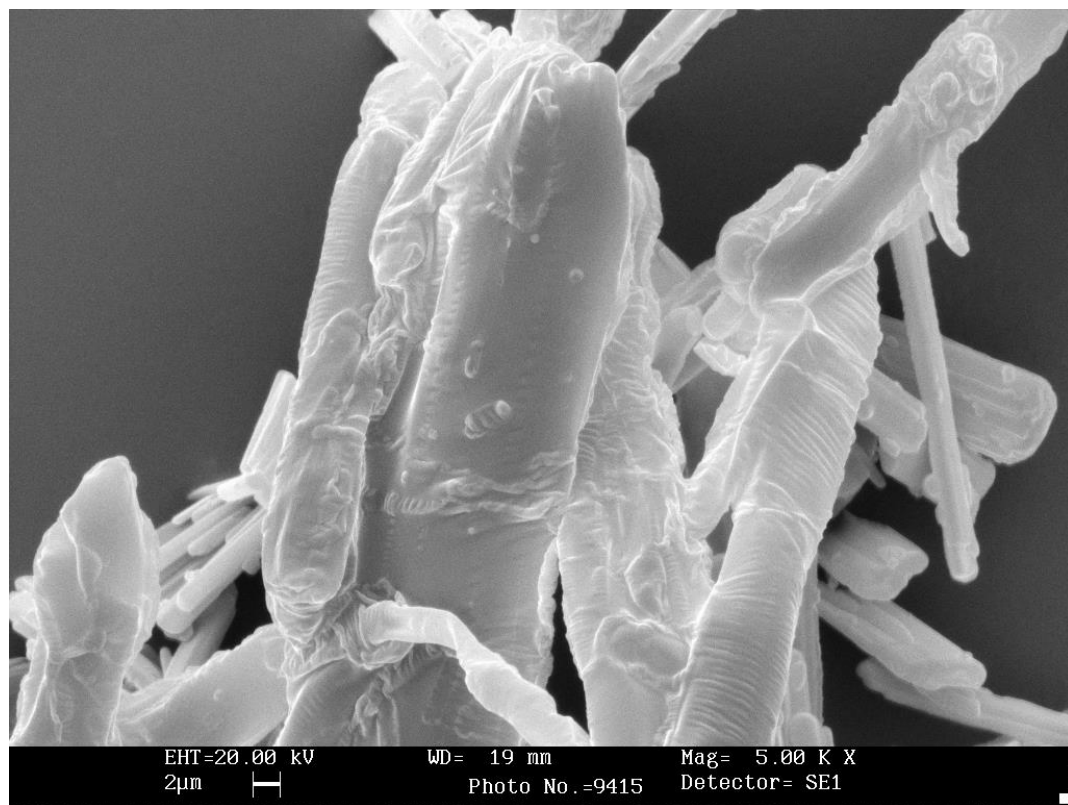
Il fascio non è fisso ma viene fatto **scandire**: viene cioè fatto passare sul campione in una zona rettangolare, riga per riga, in sequenza.

Risoluzione molto elevata! (sotto al micron)

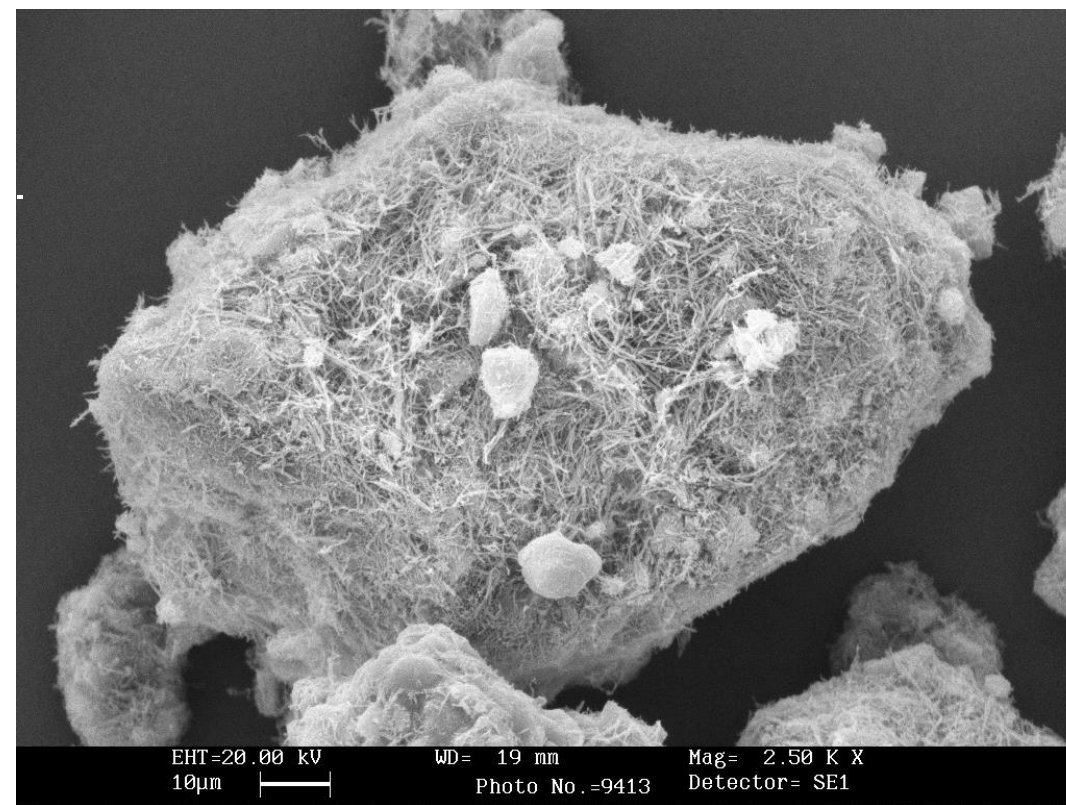


DIVERSI HABITUS DI DUE DISTINTI POLIMORFI DEL PRAZIQUANTEL

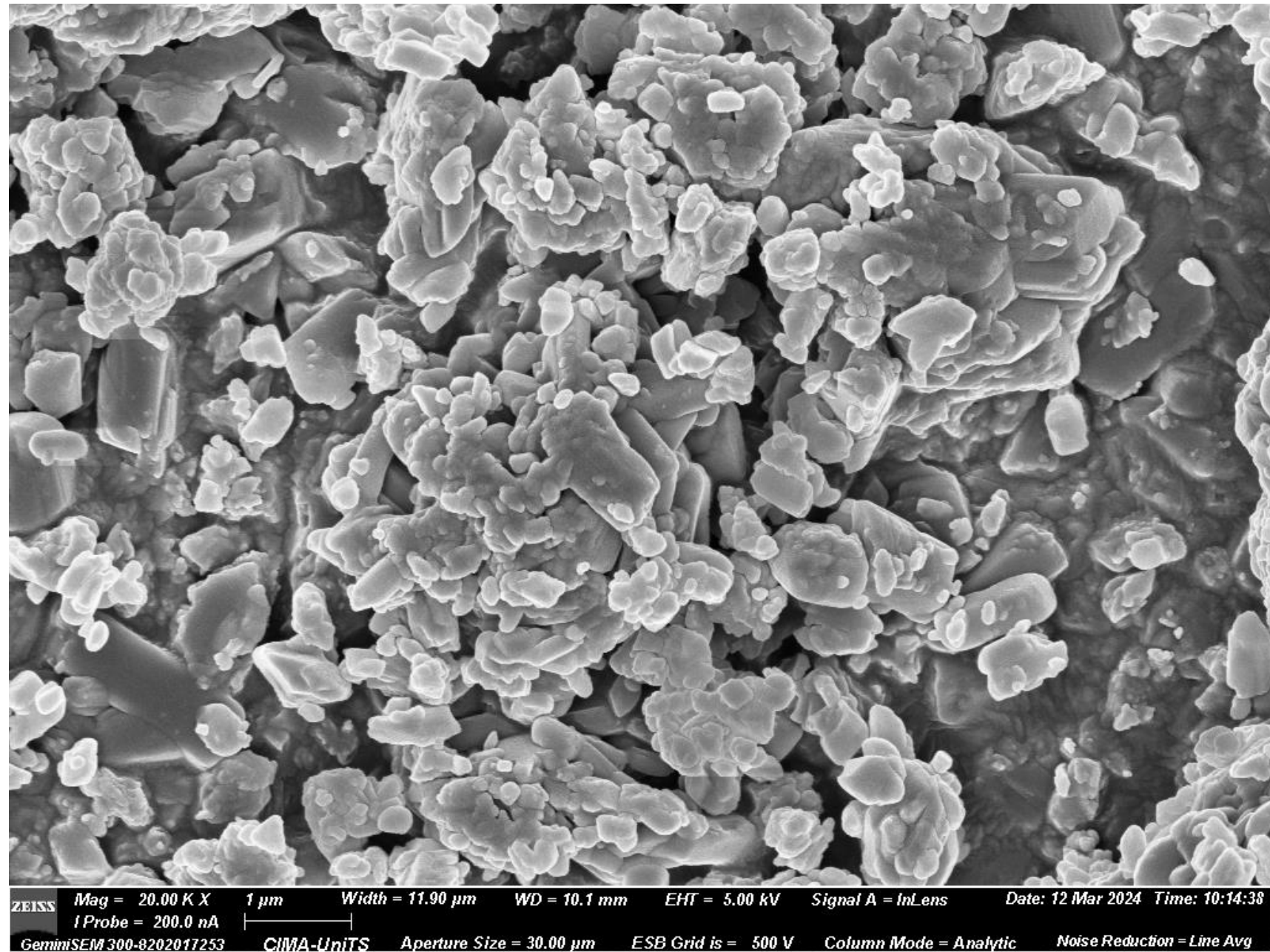
Forma A



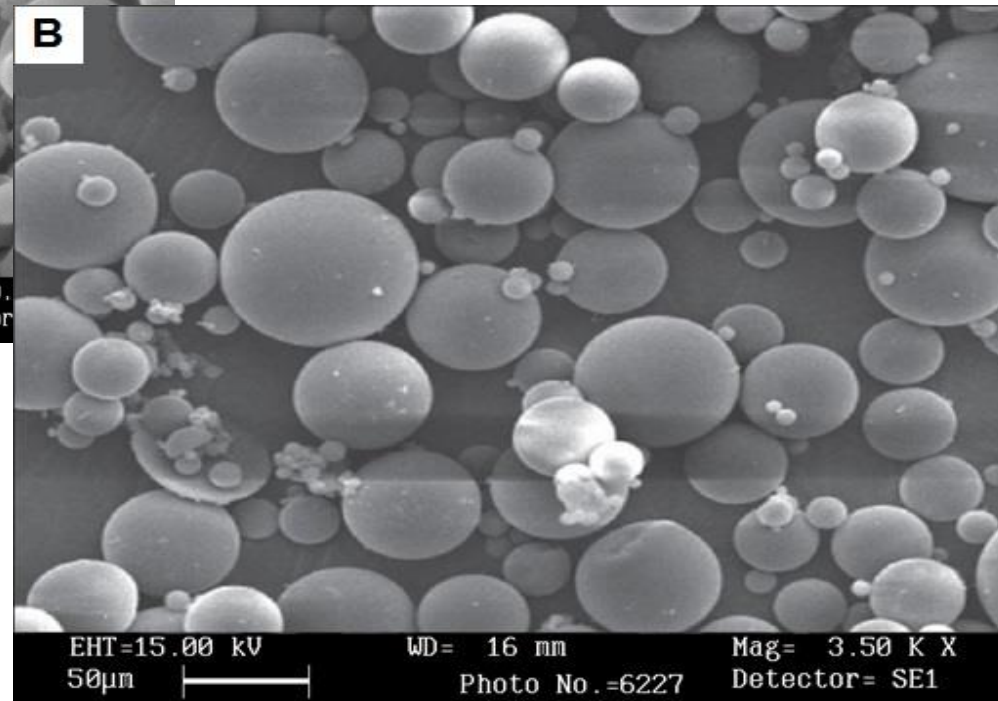
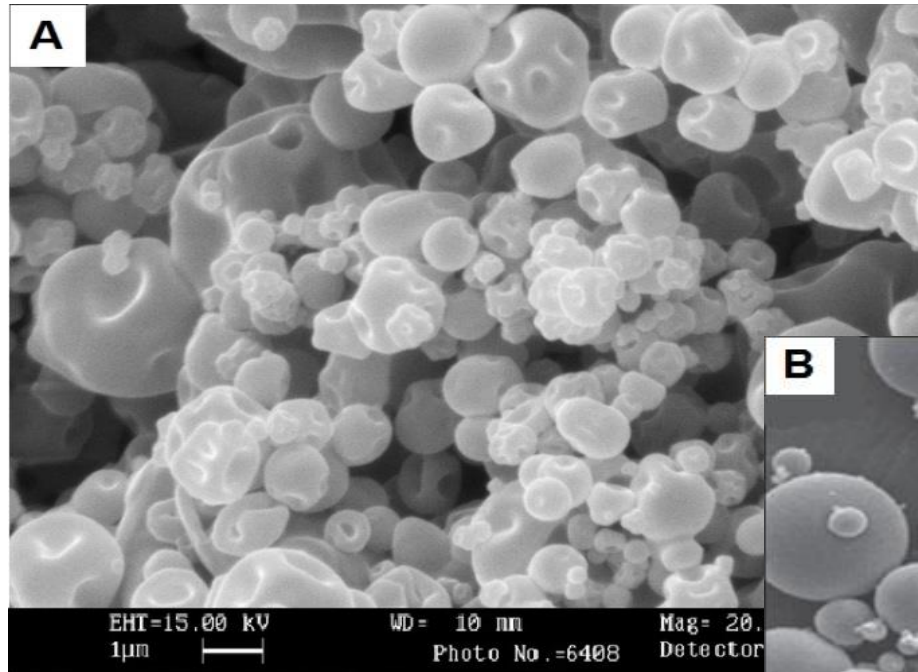
Forma B



SEM cocristallo

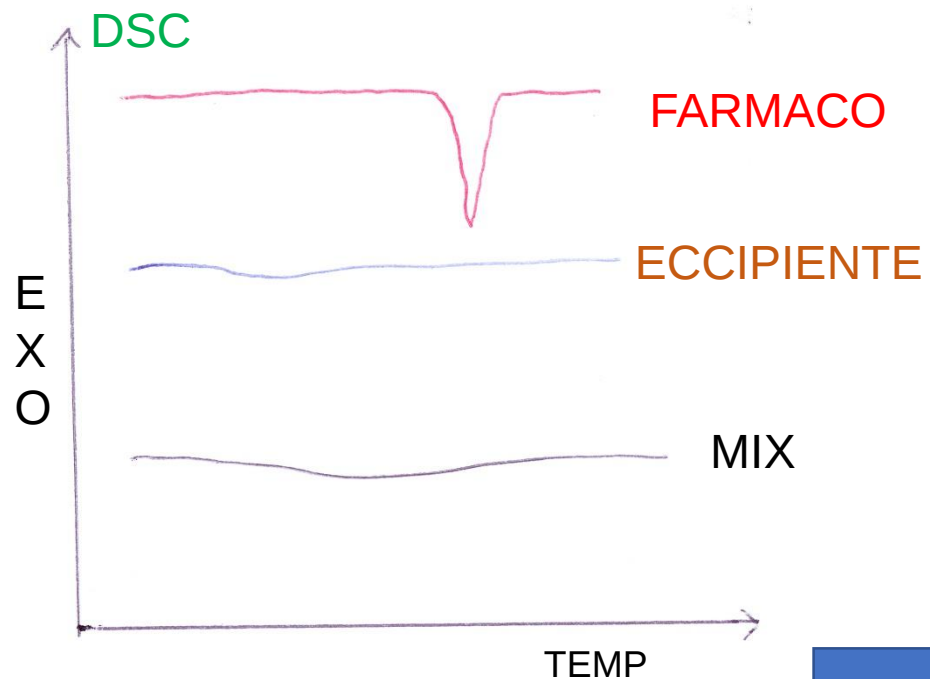


SEM anche di particelle più grandi



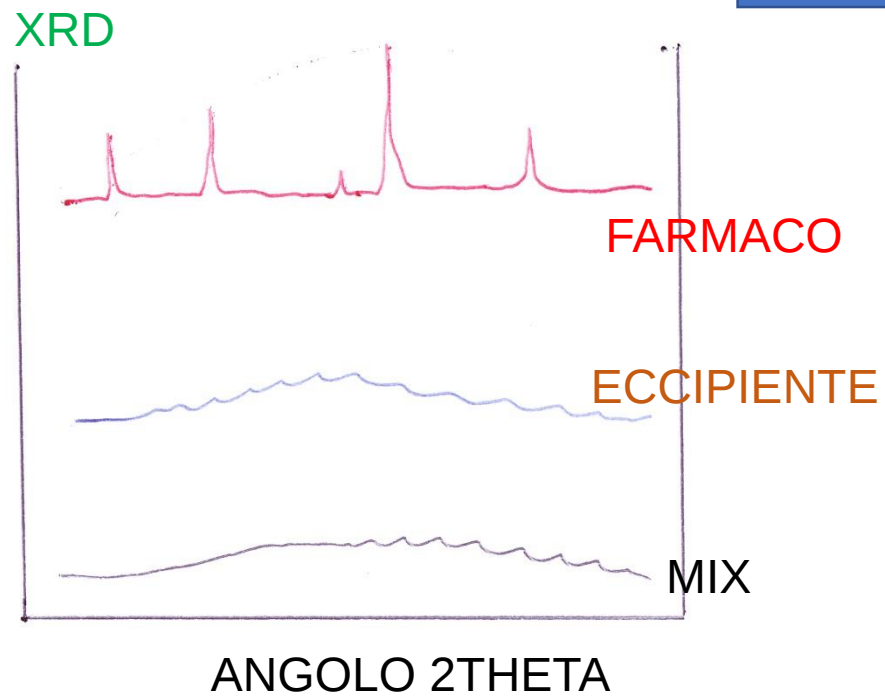
Utilizzando varie tecniche ho la certezza dell'interpretazione dello stato solido del mio campione



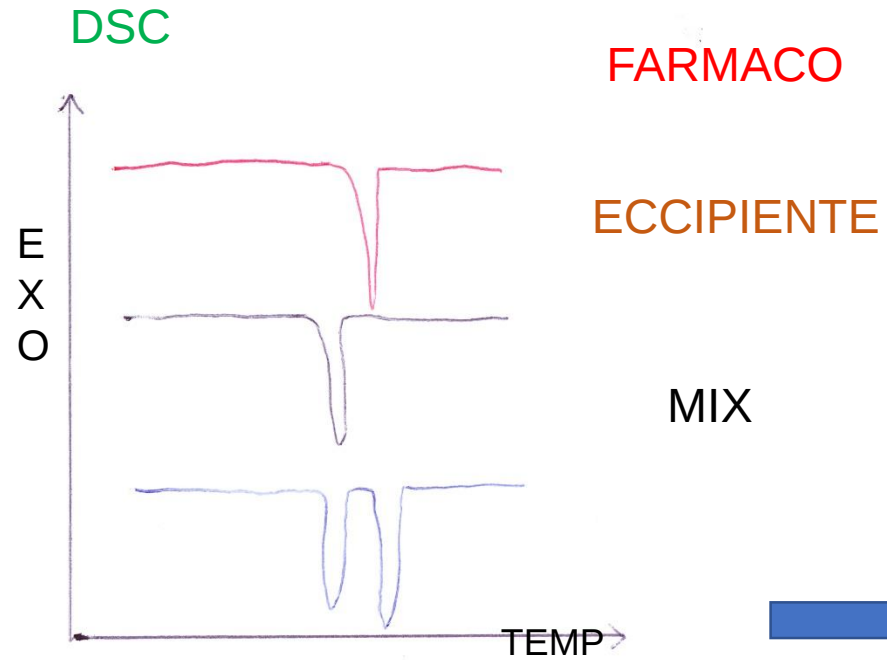


ESEMPIO DI INCOMPATIBILITA'

IL FARMACO DIVENTA AMORFO DOPO
MISCELAZIONE CON L'ECCIPIENTE

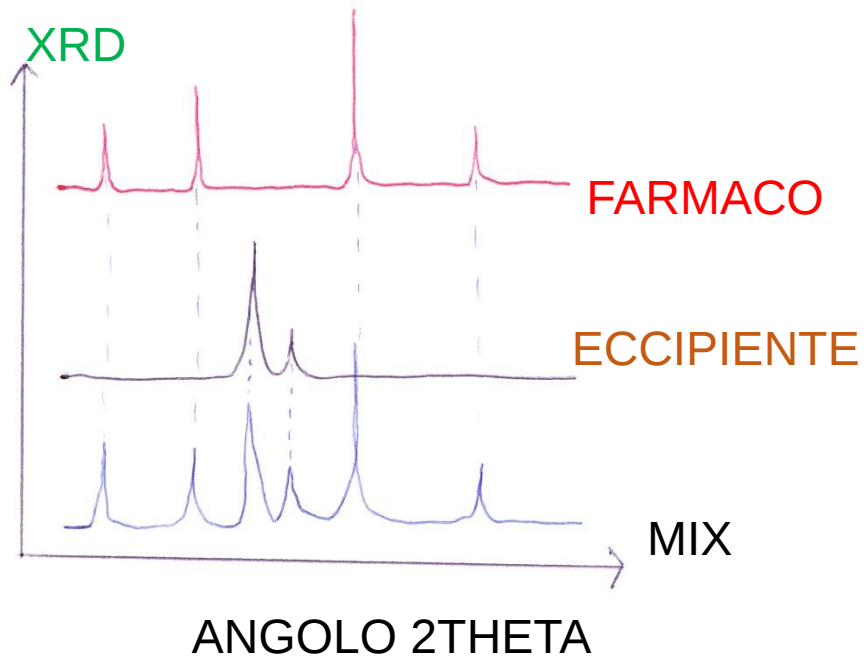


CON IL TERMOMICROSCOPIO:
UNO VOLTA rammollito
L'ECCIPIENTE NON CI SONO
CRISTALLI RESIDUI DI
FARMACO

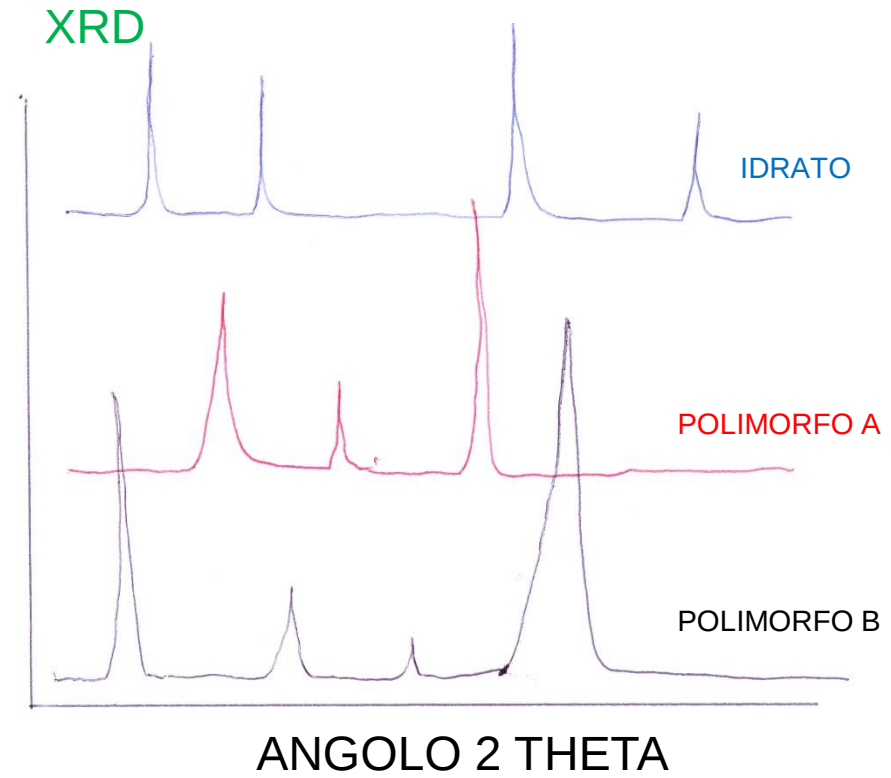
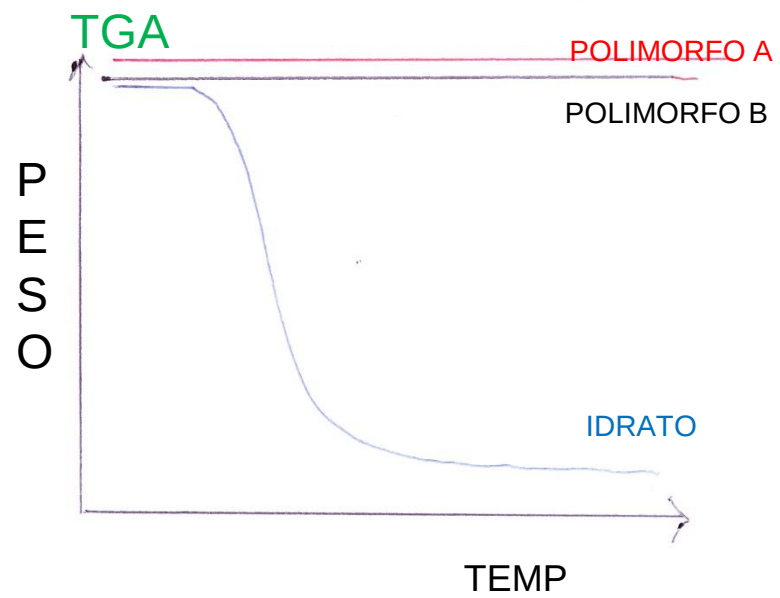
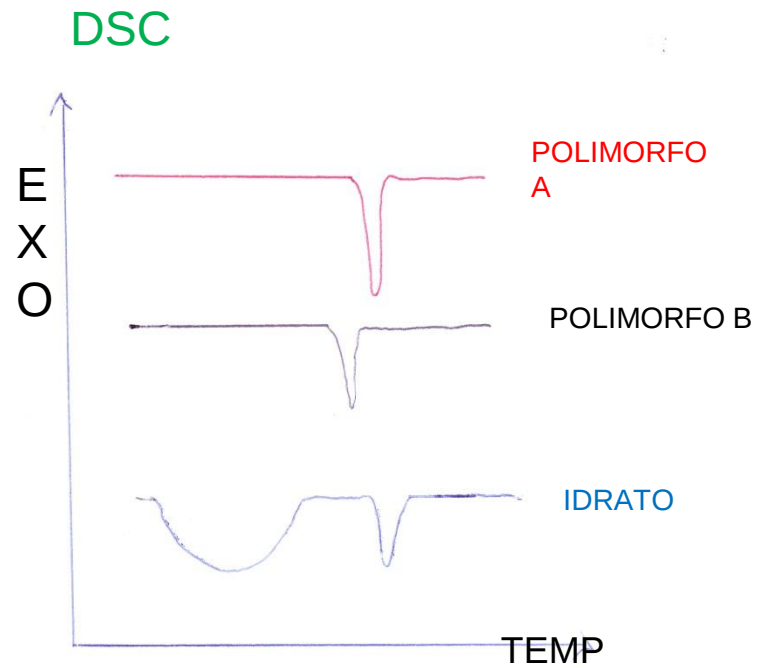


ESEMPIO DI COMPATIBILITA'

IL FARMACO RIMANE IDENTICO DOPO
MISCELAZIONE CON L'ECCIPIENTE



CON L'ANALISI INFRAROSSO :
LO SPETTRO DELLA MISCELA è
LA SOMMA DEI DUE
COMPONENTI



DISTINGUO
TRA POLIMORFI DIVERSI

TRA ANIDRI E IDRATI

DUBBI?

