

## X 射线衍射分析技术在新药及制药研究中的应用进展

吕扬\* 吴云山 郑启泰

(中国医学科学院 中国协和医科大学 药物研究所 北京 100050)

**摘要** X 射线衍射分析技术是在 20 世纪 50 年代末到 60 年代初进入我国,目前广泛应用于我国的物理、化学、地质、材料、药学等学科。虽然美国 70 年代已经将该种分析技术应用于化学药物的检测,但我国则是在 20 世纪末才将该技术列入新药和药典的部分检测项目中,本文目的是帮助药学同仁了解 X 射线衍射分析技术在药学研究中的最新进展、应用领域和主要功能。

**关键词** X 射线衍射分析 药物研究 应用进展

自 1895 年德国物理学家伦琴 (Röntgen) 发现 X 射线,并因此获得 1901 年首届诺贝尔物理学奖以来,历经百余年跨越 3 个世纪,X 射线技术一直伴随人类健康问题在医学科学中发挥着自身独特的重要作用。从医学上的人体诊断学中的透视技术、照相技术,人体治疗学中的放射技术到药学研究中,都可找到 X 射线技术的应用领域。本文将介绍 X 射线衍射分析技术在新药及制药研究中的应用进展情况。

X 射线衍射技术是针对固体药物样品成分与结构的一种有效分析检测方法。在药学研究领域, X 射线衍射分析技术又分为单晶 X 射线分析 (SXRD) 和粉末 X 射线分析 (PXRD)。单晶 X 射线分析主要应用于化学、生物药物乃至食品研究中。它可以独立完成全新的或复杂的化学药物分子结构测定,也可以完成生物药物分子、受体或复合物等大分子的结构测定任务<sup>1</sup>。单晶 X 射线分析技术是一种定量的分析方法,它可以获得被测样品分子的准确立体结构(构型、构象),包括:全未知化合物正确分子三维结构,成键原子的键长、键角、二面角值和分子的立体结构信息,溶剂(及结晶水)含量等;粉末 X 射线分析技术可用于化学药物和中药(成)药研究中,是一种定性或定量的分析技术,可用于化学药品的纯度、晶型、稳定性,以及药物制剂中原料药含量及晶型变化等检测。此外,粉末 X 射线分析方法还可以应用于传统的中药及其制剂的检测中,可以对因多组分共存而形成的中药复杂模糊体系,给出符合传统中医药整体论思想的客观标准,以图形、数值化识别、评价中药及其制剂的质量控制新分析方法。

### 1 单晶 X 射线衍射分析技术与新药及制药研究

#### 1.1 单晶 X 射线衍射

X 射线为短波长电磁波。当 X 射线照射在被测样品上时,因光的干涉作用而产生衍射效应。单晶体是指样品中所含分子(原子或离子)在三维空间中呈规则、周期排列的一种固体状态。化学药物中的原料药(一般由单一成分组成)在合适的溶剂系统中经重结晶可得到适合 X 射线衍射使用的单晶样品,其大小约为 0.5mm 左右。当 X 射线照射单晶样品而产生衍射效应时,形成以确定规律分布在空间的衍射图像,衍射点的数目,依据化合物分子量大小(药物小分子、生物大分子、复合物等)和分子的排列规律(对称性)而异。近年来,随着单晶 X 射线衍射仪器的迅速发展,高功率 X 光源设备的出现,图像板(IP、CCD 等)等新记录数据方式的问世,在短时间内(几小时)收集一套高分辨率衍射实验数据已经成为可能(完成第一次傅立叶变换)。随着结构分析计算方法的成熟和结构解析软件的高度智能化、自动化,通过运行在微机或工作站上的结构分析软件系统(晶体结构自动解析程序,如 MULTAN, SHELXS 等),经过数据处理、结构解析、结构参数精化等计算分析过程,便可在计算机屏幕上直接显示(或输出)被测样品的分子三维结构及相应的立体化学数据(完成第二次傅立叶变换)。

#### 1.2 单晶 X 射线衍射分析应用进展

进入 20 世纪 90 年代,对于经提取、分离或合成等途径得到的未知或已知化学药样品,经重结晶实验得到合用单晶后,就可以完成单晶 X 射线衍射分

\*作者简介:吕扬,女,研究员,研究方向:药物 X 射线衍射分析

析的全部工作。它不仅能够提供准确的分子相对或绝对构型,而且对分子的构象(及差向异构),成键原子间的键长、键角、扭角、二面角,分子平面性,分子内氢键与分子间氢键分布,晶态下分子的排列规律(即晶型),溶剂分子的分布与数目等均可提供准确、定量、可靠的信息,极大地缩短为获得先导化合物和药物分子正确结构所需的时间<sup>2</sup>。

#### 1.2.1 微量化合物或全未知化合物的分子结构测定

随着分离、提取等分析技术的飞速发展,从天然物中可获得低含量的化合物,单晶 X 射线衍射分析只需要一颗单晶体(约 1/4 ~ 1/6mg 量),就可直接使用单晶 X 射线分析技术独立完成所需的化合物的全部结构测定工作,而一般不再需要借助其它谱学(NMR、MS 等)信息。单晶 X 射线衍射结构分析不仅可解决全未知化合物的结构测定,还可帮助化学家完成疑难结构测定,对已知化合物结构进行确证,对错误的分子结构进行修正等工作,最终为药学家提供准确的药物分子三维结构和立体化学结构数据。

#### 1.2.2 以共晶方式存在的混合物分子结构测定

共晶在固体药物样品中是常见的现象,最简单的例子是药物分子与溶剂或结晶水分子以共晶方式存在。共晶分子结构可以由异构体形成,也可以由不同结构分子形成。在药物研究中确切地了解共晶样品的组成成分,以及它们实际存在的比例是至关重要的。单晶 X 射线衍射分析技术对药物中的共晶样品可以给出准确、定量的分析结果。

#### 1.2.3 分子绝对构型的测定

应用单晶 X 射线分析方法可获得药物分子的绝对构型,特别是全新骨架类型的药物分子绝对构型确定(如青蒿素)。测定药物分子绝对构型常用的方法有以下几种。

应用反常散射法测定分子绝对构型:利用分子中所含原子(特别是重原子)的 X 射线反常散射(色散)效应,可以准确地测定分子构型。

不含重原子的分子绝对构型测定:抗疟新药青蒿素的分子绝对构型测定就是利用非重原子 C、O 的反常散射效应实现的。因为 C、O、N 原子的反常散射效应弱,故在 X 射线衍射实验中需要采用 CuK 辐射,以准确地测量反常散射点对的衍射数据。

利用分子中已确认的局部构型信息确定分子绝对构型:对于非新骨架的分子,根据文献或波谱数据,可以确定其局部取代基的构型,以此为参照,可确定待测化合物分子的绝对构型。

引入手性溶剂确定分子绝对构型:在进行化学药物样品的重结晶过程中,选择引入手性试剂(如 D

或 L-酒石酸等)而形成共晶的单晶体,从单晶 X 射线衍射分析所得共晶组分的立体结构图中,以手性试剂的已知构型为参照,即可获得待测分子的绝对构型。

#### 1.2.4 构象分析与差向异构件

分子构象分析:在研究药物分子的活性部位及与受体的结合部位、受体大分子的三维结构与功能关系中,分子的构象分析已经成为一个十分令人关注的研究问题。从单晶 X 射线衍射分析所得分子的立体结构中,可以准确地计算出被测化合物的构象信息:即组成药物分子骨架各环的船或椅式构象、环与环间的顺反联接方式、环自身的平面性质、环与环间的扭转角、侧链的相对取向位置、大环构象等。

差向异构体的测定:在获取药物的先导化合物的过程中,经常会因手性原子上取代基位置的不同选择(、),而出现两种(或多种)的差向异构体分子(如黄皮酰胺类化合物),只有准确地了解了先导化合物分子的构象,方可获得正确的合成目标化合物。

#### 1.2.5 氢键、盐键、配位键等的计算与分子排列规律

氢键、盐键、配位键等是研究药物分子生物活性中的重要信息。利用单晶 X 射线衍射分析结果,可以准确地计算出药物分子的氢键、盐键、配位键的成键方式和数值。特别是分子内与分子间氢键的关系,将影响晶态下分析在空间形成确定排列方式,由此可获得分子在空间的层状、螺旋、隧道或空穴等各种排列关系,这些重要信息将有助于了解和解释药物分子的作用机理。

#### 1.2.6 原料药中溶剂分子的确定

在新药与制药研究中,原料药中是否含有结晶水分子或溶剂分子?特别是当重结晶过程中使用过对人体有害的溶剂时,它们是否进入晶格?其含量是多少?单晶 X 射线衍射分析可以准确地回答这些问题。

#### 1.2.7 生物大分子及其复合物的结构测定

天然产物中的水溶部分多含有蛋白质、多肽、多糖类等化合物,这类物质的生物活性一直是药物化学家关注的内容。现有波谱分析方法,除 NMR 对多肽、蛋白质等分子量低于 5 万,且有同源性质的分子结构取得进展外,欲得到更大分子的准确三维结构,还只能借助于单晶 X 射线衍射分析方法。我国晶体学家早在 20 世纪 70 年代就完成了结晶猪胰岛素的 X 射线晶体结构测定工作。

为发现和了解受体大分子与药物分子的结合部位与活性部位,在已知受体分子的立体结构时,通常对受体分子与药物分子作用后形成的复合物培养单

晶体,再应用单晶 X 射线衍射分析方法测定复合物的分子结构,为药物分子的改造和新药设计提供合理的建议。

1.2.8 计算机辅助药物分子设计与药物分子晶体结构数据库 计算机辅助药物分子设计是 20 世纪 90 年代药学研究领域中的热点,因它可以为药物的改造和修饰,以及药物的合成等提供一定的参考信息。计算机辅助药物设计的计算机软件是以分子力学、热力学、量子化学与药理学等为基础的。对于化学药物中的小分子,起始计算依据是化合物分子的三维结构数据。在各种计算软件中通常含有从二维结构自动转变形成三维结构的功能,但对那些构象较复杂或分子骨架柔性较大的化合物,时常不能得到符合真实情况的正确构象结果。单晶 X 射线衍射分析可提供不同类型、不同骨架的分子三维结构和准确的分子立体结构数据,通过对侧链基因的更换以及能量极小化计算,是获取正确分子立体结构的有效途径。为此建立中草药化学成分“药物分子晶体结构数据库”<sup>18</sup>,将为实现计算机辅助药物设计提供各类分子准确的三维结构信息和基础研究数据。

## 2 粉末 X 射线衍射分析与新药(化学药、中药)及制药研究

### 2.1 粉末(晶) X 射线衍射

当 X 射线照射的样品不是一颗单晶体,而是由许多细小(约为  $1 \times 10^2 \mu\text{m}$ )单晶粒组成的粉晶样品时,相应的 X 射线衍射图像将由于许多小晶粒在空间的随机取向而形成各自独立的单晶 X 射线衍射图像,其叠加结果形成以入射 X 射线为轴线的一组同心圆锥衍射线族。应用粉末 X 射线衍射仪,可以记录相应的粉末 X 射线衍射谱线,形成以锐峰(晶态)或弥散峰(非晶态)或二者共存的 X 射线衍射图谱,每种单一化合物(组分)应具有自身专属的指纹性粉末 X 射线衍射图谱,因此可以凭借粉末 X 射线衍射图谱准确地识别化合物(即物相分析)。美国自 1972 年开始,将化学药物的粉末 X 射线衍射列入药典。目前我国对创新类化学药物中的原料药及其制剂也要求附有粉末 X 射线衍射对照图谱<sup>4</sup>。

在化学药物的制药研究过程中,粉末 X 射线衍射技术主要应用于固体状态下单一化合物的鉴别与晶型确定、晶态与非晶态物质判断、多种化合物(包括杂质)组成的多相(组分)体系中的组分(物相)分析(定性或定量);在中药及其制剂(固态)研究中,由

于中药的源头物质中药材是来自动物、植物、矿物体,它们中绝大多数都含有大量化学组分,为复杂的多相体系(包括由此制成丸、散、膏、丹、颗粒、胶囊等剂型的成药),因此不能沿用化学药物使用的粉末 X 射线方法中的物相分析方法。为此,我们近年来建立了 X 射线衍射傅立叶(Fourier)指纹图谱分析法。

### 2.2 粉末 X 射线衍射分析在西药研究中应用进展

2.2.1 单一化合物的鉴别 单一化合物的粉末 X 射线衍射谱的形成取决于两个主要因素:组成分子的化学元素与分子在晶胞中的排列方式。为标识粉末 X 射线衍射图谱,通常使用两个主要参数:表示衍射线在空间分布的衍射角( $\theta$ )或晶面间距  $d(\text{\AA})$  与衍射线的强度( $I/I_0$ )。对于给定的单一晶型化合物,其粉末 X 射线衍射图谱具有专属性和指纹性。对于相同化合物的不同晶型,由于分子在空间的对称排列规律不同,它们的衍射图谱存在明显差异。对于不同的化合物,因其化学组成与对称性的不同而形成自身专属的 X 射线衍射图谱。国际上已经分别建成各类化合物(无机化合物,有机化合物,矿物……)的粉末 X 射线衍射数据库(如最著名的美国国际衍射中心的 PDF 库),使用者可按分子式、化合物名称、谱线的  $d$  与  $I/I_0$  值进行化合物检索。

通过对单晶 X 射线衍射分析获得的单晶结构数据(对称群、晶胞参数、原子坐标)经理论计算后,可得到该化合物的理论粉末 X 射线衍射图谱,这种方法适用于对创新药物或缺乏对照品的固体类新药鉴别,依此可建立药物样品的标准粉末 X 射线衍射图谱。

2.2.2 单一化合物的晶型确定 晶型实际上是结晶状态下晶胞中分子对称排列的规律的表现。药物在固体状态下,其成分因晶型不同有可能影响药物的疗效。如果有对照品或标准品,则由粉末 X 射线衍射图谱中的  $d$  与  $I/I_0$  值的一致性,便可判定原料药晶型的正确性;如果是创新药,不但要有原料药的粉末 X 射线衍射图谱,还应该附有该晶型的单晶理论计算粉末 X 射线衍射数据,以确认化学药物结构和晶型的唯一性。

虽然有些化学药物的原料药在形成制剂后采取无定型(非晶态)状态,通过粉末 X 射线衍射分析仍可以确定制剂中原料药的晶型存在方式,即晶态、非晶态,或二者共存的状态。

2.2.3 原料药纯度的确定 当化学药物中的原料药是以单一化合物形式出现,通过粉末 X 射线衍射物相分析,一般可以识别含量在 1% 以上的“杂质”,

这些杂质可以是反应不完全物质,也可以是异构体,或者是不同晶型物质,或者是晶态与非晶态混合物等;当原料药是以多组分(复相)形式存在时,则应进行含量比例测定,并获得相应的粉末 X 射线衍射图谱。

2.2.4 多晶型原料药的晶型含量测定 当某种固体药物存在多晶型问题时,需要应用粉末 X 射线衍射分析技术和方法建立该药物的晶型含量测定标准,以此来控制有效晶型在原料药和药物制剂中的含量值,防止由于晶型不同而对药物疗效的影响。

2.2.5 原料药的稳定性和影响因素测定 为确认生产工艺的稳定性,通常采取对三个不同批号的原料药样品进行检测;对存放时间、环境温度、湿度与光照、加速试验等可能改变药物样品性质的影响因素,也需要通过粉末 X 射线衍射分析方法进行检测,给出定性定量的分析结果。

2.2.6 药物制剂的质量控制 添加各种辅料或赋形剂而制成药物制剂后,仍然需要应用粉末 X 射线衍射分析技术鉴别药物制剂中原原料药的晶型稳定性及含量,建立药物制剂的对照粉末 X 射线衍射图谱,用来对以相同配方、相同工艺生产的不同生产厂家、不同生产批号药品的质量控制。

### 2.3 粉末 X 射线衍射分析在中药研究中的应用与前景

2.3.1 X 射线衍射傅立叶(Fourier)图谱分析法 与化学药相比,中药及其制剂都是由多种化学成分组成的复杂多相系统,因此不能使用对单一化合物分析的物相分析方法来剖析中药及其制剂组分。X 射线衍射傅立叶指纹图谱分析法是基于中医药的整体论思想,并以组成中药方剂的源头物质中药材作为基础。当 X 射线照射到经机械粉碎过 100~200 目筛后制成细粉的中药材样品上时,包含在中药材中的几十种化学成分将产生各自独立的粉末 X 射线衍射图谱,它们的叠加就形成一幅表示该中药材整体结构特征的粉末 X 射线衍射指纹图谱。中药材的粉末 X 射线衍射傅立叶指纹图谱是由衍射图谱的图形几何拓扑规律与特征标记峰值构成。将通过性状显微宏观鉴定确认的中药材经 X 射线衍射实验转换为一幅在衍射空间以图形、数值表示的专属粉末 X 射线衍射指纹性图谱,既包含中药材的全部成分,也体现各种成分的相对含量值,由此可以实现对中药材的鉴定、分类与质量控制目的。

2.3.2 中药材的 X 射线衍射傅立叶图谱分析 植物、动物、矿物等中药材因产地、物候、地貌、环境、时

间等变化,使其形成既有共同成分,又有含量差异的带有模糊性质的复杂体系。通过对百余种经生药学家鉴定的中药材(标本或对照药材)的粉末 X 射线衍射分析,建立鉴定识别中药材的 X 射线衍射傅立叶指纹图谱分析方法,对不同产地的同一种中药材,按 X 射线衍射傅立叶图形拓扑规律与特征标记峰建立了新的分类方法。

2.3.3 中成药的 X 射线傅立叶图谱分析 拓展中药材 X 射线衍射傅立叶图谱分析方法到中成药,通过对牛黄解毒丸、牛黄解毒片、金水宝等 40 余种中成药进行的粉末 X 射线衍射分析,建立对中成药产品识别鉴定与质量控制方法,以及高含量组分的标识,表明此方法的广阔应用前景。

### 3 结语

综上所述,X 射线衍射分析技术在新药及制药研究中有广阔的应用范围和前景,是一种现代物理分析技术,可以帮助人类认识和了解未知微观世界物质存在的形式与状态,可以给出定性定量分析结果。其分析测试结果重复性好,再现性强,减少人为因素的影响,是目前世界先进国家普遍接受的一种物理分析技术和测试手段<sup>5-7</sup>。随着我国加入 WTO,进出口贸易的增加,X 射线衍射分析技术将在我国传统药物(中药材、中成药)和创新药物(化学药物)研究中发挥更大的作用。

### 参考文献

- 1 Guskert J. P. Crystal Structure Analysis for Chemists and Biologists, VCH Published, Inc, 1994
- 2 中国医学科学院药物研究所.《中草药现代化研究》仪器分析卷,北京:协和医科大学北京医科大学联合出版社,1999
- 3 吕扬,郑启泰,吴楠等.中药材 X-射线衍射图谱研究,药学学报,1997,32(3):193~198
- 4 国家药典委员会.《中华人民共和国药典》2000 版,附录 70
- 5 聂晶,田颂九,王国荣.中药指纹图谱的研究现状,中草药,2000,31(12):881~884
- 6 张汉明,许铁峰,秦路平等.中药鉴别研究的发展和现代鉴别技术介绍,中成药,2000,22(1):101~110
- 7 王宝琴,周富荣.中药标准化回顾,中成药,2000,22(1):22~32

(下转第 19 页)

小测量范围,并使系统的调试难度加大。由于高斯光束的腰斑与束腰长度存在着相反的综合调整,需要对二者作折中,并通过光路的优化设计减小测量误差。外界强电磁干扰是影响测量精度的另一个主要原因,尤其是声光晶体驱动器发射的40MHz及其谐波信号的泄漏,由于它与信号的载波频率相同,因此需要采取高级的信号处理算法消除。外界影响尤其是振动会使光路结构参数发生变化,是引起误差的主要因素。

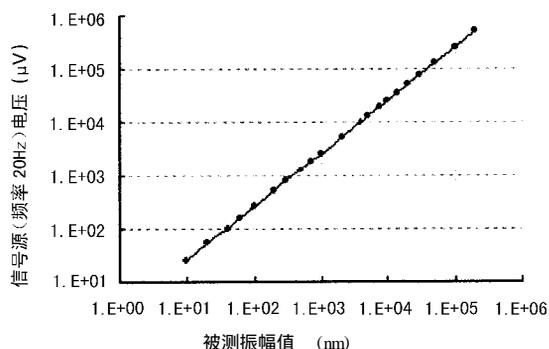


图4 系统测量振动的线性特性

#### 4 结束语

理论分析和实验结果表明,采用外差法激光多普勒测量微小振动,可以提高位移测量的分辨率;合理的信号处理带宽设计,可以有效的提高测量系统的动态范围。可以应用于半导体工业、汽车、机床、建筑物、地震波等的动力学特性测量分析中。

#### 参考文献

- 1 李庆忠(院士). 地震高分辨率勘探中的误区与对策[J], 石油地球物理勘探, 1997, 32(6): 751 ~ 783
- 2 Goldberg, Howard; Gannon Jeff, Marsh James, An extremely low - noise micromachined accelerometer with custom ASIC circuitry[J], Sensors (Peterborough, NH), 2001, 18(5): 52 ~ 56
- 3 丁桂兰, 刘振富, 陈才和等. 三分量全光纤加速度地震检波器的设计[J], 光电子 激光, 2002, 13(1): 50 ~ 52
- 4 Gulio D Emilia. Evaluation of measurement characteristics of a laser Doppler Vibrometer with fiber optic components. Proc. SPIE, 1994, 2358: 240 ~ 247
- 5 杜振辉, 贺顺忠, 蒋诚志等. 激光多普勒效应回轮体表面轮廓测量系统[J], 光电子 激光, 2003, 14(9): 977 ~ 980

### Study on measurement technique of seismic wave in real - time utilizing laser doppler effect

Huang Fuxiang<sup>1</sup> Du Zhenhui<sup>1</sup> Li Chaoyang<sup>2</sup> Lv Lina<sup>1</sup> Jiang Chengzhi<sup>1</sup>

(1. State Key Lab of Precision measuring Technology and Instruments, Tianjin Uni, Tianjin, 300072, China)

(2. Radio Factory, Tianjin University, Tianjin, 300072, China)

**Abstract** The magneto - electric geophone has a few troubles such as electromagnetic interference, permanent magnet's non - linearity. A new method of seismic acquisition using laser Doppler effect with an optimized differential optical configuration is proposed. The frequency bandwidth is properly determined by analyzing the frequency of the Doppler signal. The velocity, displacement, acceleration and frequency to be measured can be acquired in real - time by F/V converting the FM Doppler signal. A 100dB dynamic range and the linear frequency range of 1.0 to 1000Hz are realized.

**Key words** Geophone Doppler effect Seismic prospecting Vibration measurement

(上接第9页)

### The application progress of X - ray diffraction analysis technique in new drug and pharmacy research

Lv Yang Wu Yunshan Zheng Qitai

(Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Medical Sciences and

Peking Union Medical College Beijing 100050 China)

**Abstract** X - ray diffraction analytical technique appeared in China from the end of 1950's. Now it is widely used in physics, chemistry, geology, biology, material science, pharmacy etc. This analytical technique has been applied in medicine detection from 1970 in USA. But in China, it is not listed in the partly items of new drug and China Pharmacopeia until the end of the 20th century. This paper can tell you the newest progress, application areas and major function of X - Ray diffraction analytical technique in pharmacy research. It is helpful to the researcher of pharmacy.

**Key words** X - Ray diffraction analysis Pharmacy research Application progress