

ELEKTRONOVÁ DIFRAKCE – NOVÝ NÁSTROJ PRO ŘEŠENÍ KRYSTALOVÉ STRUKTURY LÁTEK

LUKÁŠ PALATINUS^a a BOHUMIL KRATOCHVÍL^b

^a Oddělení strukturální analýzy, Fyzikální ústav Akademie věd ČR, v.v.i., Cukrovarnická 10/112, 162 00 Praha 6,

^b Ústav chemie pevných látek, Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Technická 5, 166 28 Praha 6

palat@fzu.cz, bohumil.kratochvil@vscht.cz

Došlo 15.3.21, přijato 27.5.21.

Klíčová slova: transmisní elektronový mikroskop, 3D elektronová difrakce, strukturální analýza, nanokrystal, molekulární krystal

Obsah

1. Úvod
2. Difrakce
3. Metoda elektronová difrakce
 - 3.1. Uspořádání experimentu a sběr dat
 - 3.2. Vyhodnocení dat
 - 3.3. Aplikace
 - 3.3.1. Struktury molekulárních krystalů
4. Závěr

1. Úvod

Stanovení struktury molekul a jejich uspořádání v krystalu včetně vazebných interakcí je klíčem k pochopení řady chemických a biologických dějů, např. mechanismu působení léčiv, vitaminů, toxinů a jiných látek v organismu, účinku katalyzátorů v chemických technologiích nebo biokatalyzátorů (enzymů) v lidském těle, nebo vlivu environmentálních kontaminantů na životní prostředí atd. Chemici používají dvě hlavní techniky pro stanovení struktury molekul a krystalů: rentgenovou difrakci (XRD) a nukleární magnetickou rezonanci (NMR). Obě vychází z krystalického vstupního materiálu, což se promítá i do názvů oborů: RTG krystalografie¹ a NMR krystalografie². Tyto metody jsou v určitých situacích komplementární, i když NMR spektroskopie v pevné fázi, i přes rychlý aplikační rozvoj, není alternativou schopnou konkurovat rutinním RTG difrakčním technikám.

Vyřešené struktury organických a organometalických molekulárních krystalů jsou od roku 1965 ukládány do největší krystalografické databáze CSD (The Cambridge Structural Database)³, která k roku 2020 obsahovala více než 1 milion experimentálně stanovených struktur. Na-

prostá většina těchto struktur byla stanovena RTG difrakcí (>95 %) a zbytek technikami NMR, neutronové a elektronové difrakce⁴.

Klasická RTG strukturální analýza (SCXRD, viz seznam zkratk) se provádí na monokrystalu zkoumané látky. Pro úspěšný sběr dat stačí monochromatickým RTG svazkem ozářit objem řádově 0,01 mm³ monokrystalického materiálu. Vypěstovat takový monokrystal je dosažitelné asi u 90 % organických a anorganických sloučenin, a tak za více než stoletou existenci se monokrystalová RTG strukturální analýza vyvinula v precizní techniku s vyspělým a automatizovaným sběrem dat a rychlými algoritmy řešení. Kompletní změření a vyřešení struktury z monokrystalu dnes trvá řádově hodiny.

Zhruba 10 % látek však krystaluje velmi neochotně nebo pouze jako mikrokrytalický prášek (velikost zrna řádově 0,01 mm a méně). Jedná se např. o produkty pevnolátkových chemických reakcí. Samostatnou disciplínou je krystalizace proteinů, u kterých jsou dosažitelné monokrystalové velikosti 10⁻¹–10⁻² mm. Primárním produktem řady průmyslových odvětví (např. farmaceutického průmyslu) jsou ovšem mikrokrytalické prášky a zde je nutné analyzovat právě primární materiál, protože při jeho překrystalování na monokrystal pro SCXRD hrozí vznik jiné fáze (např. jiného polymorfu nebo solvátu).

Limitující problém velikosti vstupního monokrystalu k měření lze v RTG krystalografii řešit několika způsoby. V posledních 20 letech se rychle rozvíjí řešení struktury z polykrystalických (práškových) materiálů. Zde jsou ovšem omezení v nižší přesnosti dosaženého řešení ve srovnání s monokrystalem, nedosažitelná je absolutní struktura, polohy atomů vodíku a kromě toho doba výpočtu potřebného pro vyřešení struktury exponenciálně narůstá v závislosti na míře vnitřní flexibility molekuly (počet tzv. parametrů DOF – degrees of freedom). Jiným východiskem je použití intenzivního synchrotronového záření v RTG oblasti, kterým lze získat kvalitní difrakční data z mikrokrytalů, hraničních rozměrů 5–10 μm (viz proteiny nebo mikrokrytalové separované z prášku). Také tato technika má svá omezení, protože řada látek ozáření intenzivním synchrotronovým svazkem nevydrží. Kromě toho synchrotron je výjimečné zařízení, které pro většinu výzkumníků není běžně dostupné. Zajímavými vývojovými trendy jsou změření série rychlých difrakčních snímků (Serial Snapshot Crystallography) na synchrotronu⁵ nebo pomocí elektronové difrakce⁶ a potom difrakce na pseudo-monokrystalu složeném z magneticky uspořádaných mikrokrytalů (MOMA – Magnetically Oriented Microcrystal Arrays)⁷.

Relativně aplikačně novou metodou a dalším hráčem na poli strukturální analýzy se postupně stává 3D elektronová difrakce (3D ED), které postačuje nepatrné množství vstupního materiálu (nanokrystal). I když řada problémů

s ní spojených čeká na vyřešení, má velký potenciál rozvoje. Určitě bude čím dál více zajímavou pro chemiky a její rozvoj v ČR byl proto podpořen grantem GA ČR EXPRO „Nanokystalografie molekulárních krystalů“ (řešitel Dr. ret. nat. Lukáš Palatinus z Fyzikálního ústavu AV ČR). Projekt je šestiletý a jeho řešení bylo zahájeno v roce 2021. Klade si za cíl vyvinout sadu nástrojů, metod a programů s ambicí ustanovit nové standardy v oboru elektronové kystalografie molekulárních krystalů a proměnit tuto metodu v plně rozvinutý a obecně přijímaný nástroj pro analýzu nano- a mikrokystalických molekulárních materiálů.

2. Difrakce

Z fyzikálního hlediska je difrakce rozptyl sondujícího záření na rozptylujících centrech (překážkách) a následná interference rozptýlených paprsků. To znamená, že energie rozptýlená překážkou se šíří pouze v určitých směrech. Pokud má sondující záření vlnovou délku srovnatelnou nebo menší než je vzdálenost mezi rozptylovými centry (např. atomy v krystalové struktuře ozařované monochromatickým RTG zářením laboratorní rentgenky Cu K α : $\lambda = 154$ pm), potom je výsledkem difrakčního experimentu ustálený difrakční obraz, ve kterém je zakódována informace o trojrozměrném vnitřním uspořádání atomů v materiálu.

3. Elektronová difrakce

Vzhledem k vlnovým vlastnostem elementárních částic (Louis de Broglie, 1924), vykazují difrakční jev i svazky elektronů a neutronů dopadající na krystaly. Mají-li elektrony energii 50–200 eV, nepronikají do objemu krystalu, ale zpětně se odrážejí od atomů na povrchu. Tyto tzv. pomalé elektrony se využívají v metodě LEED (Low Energy Electron Diffraction), která slouží ke studiu povrchu materiálů, především k identifikaci přítomných fází. Fázovou identifikaci umožňuje také RTG difrakční prášková analýza (PXRD), i když ta potřebuje větší množství vstupního materiálu než LEED. Při výrazně vyšších energiích dopadajících elektronů, zhruba od prvních desítek keV, relativistické elektrony mohou prozářit tenkou vrstvu zkoumané látky, např. nanokrystal, difraktují a poskytnou analyzovatelná difrakční data, tzn. intenzity a polohy difrakcí, z kterých lze stanovit krystalovou strukturu.

Metoda elektronové difrakce pro strukturální aplikace je známa relativně dlouho, viz průkopnické práce Vainšteina⁸ a potom Dorseta⁹. Zatím však není tak dokonale propracovaná a automatizovaná technikou, jako současná SCXRD a není běžně přístupná široké chemické komunitě. V posledních 15 letech však dochází k jejímu prudkému rozvoji navzdory tomu, že jev elektronové difrakce je z hlediska analytického využití principiálně komplikovanější než RTG difrakce. K širšímu povědomí o 3D ED mezi chemiky a biochemiky přispěly práce Kolbové¹⁰, Hommöllera a Zou¹¹, Gonena¹² a jejich spolupracovníků,

kterí ukázali, že tato technika může být s úspěchem použita pro stanovení struktury anorganických a organických sloučenin, metalokomplexů i proteinových struktur. Současný stav oboru 3D ED shrnuje bilancující práce Gemmiho a spol.¹³.

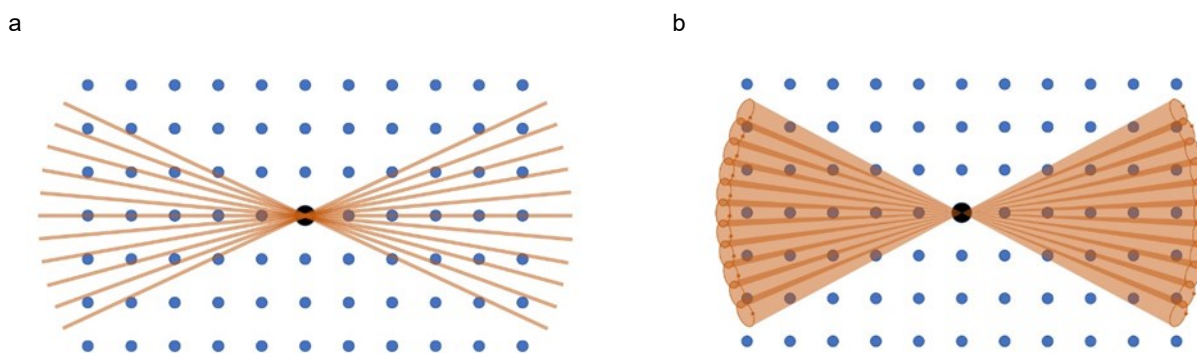
3.1. Uspořádání experimentu a sběr dat

Experiment 3D ED se provádí na transmisním (prozařovacím) elektronovém mikroskopu (TEM). V difrakčním módu mikroskopu se data sbírají z jednoho nanokrystalu látky (objem $1-10^{-4}$ μm^3). Velikosti nanokrystalu je uzpůsobena i šířka sondujícího elektronového paprsku, která se pohybuje od jednotek nm až k několika μm . Oproti RTG monokrystalové analýze je potřebná velikost krystalů pro 3D ED o 2–3 řády menší, což je z hlediska přípravy a dostupnosti vzorku velmi významné.

Při metodě stacionárního elektronového paprsku je datový soubor v 3D ED sledem difrakčních obrazců zaznamenaných postupně v různých úhlech náklonu TEM goniometru, resp. vzorku. Pólové nastavce objektivu však omezují úhly náklonu, takže jejich rozsah obvykle nepřekročí $120^\circ (\pm 60^\circ)$. Tento chybějící klín v difrakčním prostoru ED však může být vyplněn buď pomocí symetrie krystalu, nebo sběrem dat z více různě orientovaných krystalů. Problémem stacionárního sběru dat je, že nepokrývá oblasti reciprokého prostoru mezi jednotlivými stacionárními obrazy.

Tento problém může být řešen sběrem dat v precesním režimu. V tomto režimu elektronový paprsek vykonává precesní pohyb s vrcholem kužele na vzorku a s vrcholovým úhlem obvykle $0,5-2^\circ$. Tento precesní pohyb zajišťuje sběr integrovaných difraktovaných intenzit (obr. 1). Uvedená metoda se označuje jako precesní elektronová difrakční tomografie (PEDT)¹⁴, příp. 3D ED s precesí. Další možností, jak vyřešit problém mezer mezi stacionárními difrakčními obrazy, je rotační elektronová difrakce (RED)¹⁵, která využívá jemných kroků náklonu paprsku dosažených pomocí vychylovacích cívek TEM, nebo metoda kontinuální rotace (označovaná také jako c-RED, IEDT nebo MicroED), při které dochází k expozici detektoru během rotace krystalu okolo osy goniometru. Techniky sběru dat v ED se ovšem velmi rychle vyvíjí¹³. V závislosti na metodě sběru dat a citlivosti detektoru trvá záznam dat z jednoho krystalu řádově desítky sekund až ca 20 minut. To je podstatně kratší doba než je běžné u SCXRD, byť i zde dochází k vývoji a zkracování doby experimentu. Výsledkem experimentu 3D ED (i SCXRD) je soubor obsahující obvykle několik tisíc až několik desítek tisíc reflexí.

Nanokrystaly měřené ED jsou samozřejmě velmi citlivé na jakoukoliv mechanickou nestabilitu TEM goniometru, která může vzorek snadno vychýlit z ozařované oblasti. Stabilita mechanického pohybu goniometru je obvykle nedostatečná na to, aby tento pohyb bylo možné použít pro udržování krystalu v elektronovém svazku. Mnohem jednodušší je posunovat svazkem tak, aby sledoval pohyb krystalu. To lze provést dvěma způsoby. První možností je vždy po několika stupních otočení sejmout



Obr. 1. Schématická reprezentace sběru dat metodou stacionárního paprsku (a) a v precesním režimu (b). Modré tečky: uzly reciproké mřížky. Oranžové oblasti: oblast reciprokého prostoru pokrytá jedním difrakčním obrazcem. Precesní pohyb na obrázku (b) je naznačen elipsami se šipkami. Úhlové rozsahy oblastí pokrytých precesním pohybem se mohou překrývat. Barevná verze obrázku je dostupná na webových stránkách časopisu Chemické listy.

obraz krystalu a podle jeho posunutí posunout elektronový svazek. Druhou možností je nejprve zmapovat pohyb krystalu a potom při samotném experimentu posunovat svazek podle této předem zjištěné trajektorie^{16,17}.

3.2. Vyhodnocení dat

Protokoly v 3D ED zajišťují optimální sběr integrovaných intenzit difrakcí a jejich poloh. Existuje řada softwarových balíčků pro redukci dat speciálně vytvořených pro 3D ED nebo upravených ze software pro RTG difrakční data. Ve srovnání s RTG difrakcí však u 3D ED existují dva důležité rozdíly:

a) Polohy difrakcí na detektoru jsou u 3D ED nepřesné:

Nepřesnost stanovení poloh difrakcí je způsobena přítomností mnoha optických prvků v elektronovém mikroskopu mezi vzorkem a detektorem. To se promítne do nepřesnosti stanovení mřížkových parametrů. Tato nepřesnost může dosáhnout až několika procent v určení délky hrany elementární buňky a až do jednoho stupně v meziosním úhlu. Přesnost stanovení mřížkových parametrů je v současnosti u SCXRD až 20× lepší. Prostor pro řešení tohoto problému existuje, i když doposud navržená řešení jsou stále nedostatečná^{18,19}.

b) Vícenásobný rozptyl elektronů ve zkoumaném materiálu:

Na rozdíl od rentgenových fotonů nesou elektrony záporný náboj, a proto je jejich interakce s atomy v krystalu o několik řádů silnější. To má za následek vícenásobný rozptyl elektronů v materiálu. Tato situace je ve fyzice známa jako dynamická difrakce. Oproti tomu při difrakci RTG záření k vícenásobnému rozptylu téměř nedochází a tuto situaci popisuje jednodušší, tzv. kinematická teorie difrakce.

Intenzity a polohy difrakcí v ED se dále zpracovávají postupy analogickými SCXRD. Tím je méně upřesnění mřížkových parametrů, výpočet a upřesnění poloh atomů a dalších parametrů a výpočet map elektrostatického potenciálu. Pro upřesnění struktur z 3D ED dat se používají dva přístupy. Buď je vícenásobný rozptyl ignorován a pro výpočet modelových intenzit je použita kinematická teorie

difrakce. Toto je pouze hrubá aproximace, která vede k snížené přesnosti výsledků a ke zvýšeným hodnotám R-faktorů (kritérium správnosti stanovení struktury, čím jsou hodnoty R-faktorů vyšší, tím je, statisticky, struktura stanovena méně spolehlivě). Alternativou je výpočet modelových intenzit za použití dynamické teorie difrakce. Tento přístup se nazývá dynamické upřesnění²⁰ a jeho výhody byly demonstrovány na řešení struktur řady různých materiálů^{21–24}. Nicméně i dynamické upřesnění má nedostatky, protože ve své aktuální implementaci neuvažuje defekty a nedokonalosti krystalů. Ty hrají v případě dynamické difrakce významnější roli než v kinematickém případě.

3.3. Aplikace

První aplikační studie 3D ED byly provedeny se stacionárním paprskem na anorganických materiálech, které jsou stabilní, např. minerál čaroit²⁵. Potom se aplikace rozšířily i na další typy sloučenin a v poslední době především na farmaceutické molekulární krystaly a biologické struktury (proteiny). Molekulární krystaly a proteiny jsou ovšem daleko méně stabilní a pod stacionárním paprskem se snadno rozkládají (tab. I). Hlavní výhodou 3D ED je nepatrný vstupní vzorek (velikosti o rozměrech 10–10² nm) a potom láková možnost strukturální identifikace jednotlivých částic (zrn) v kompaktních maticích bez nutnosti separace. To SCXRD umí jen obtížně. Rychlým tempem se v ED zdokonaluje měřicí technika, režimy měření a algoritmy vyhodnocení dat.

V materiálovém výzkumu byly metodou 3D ED studovány např. fázové přechody na úrovni jednotlivých zrn a precipitátů, viz struktura fáze Eu₂Si₂O₇ v křemenné matici²⁶. Zajímavá je i strukturální studie elektrodového materiálu v Li-iontových bateriích *in situ* při nabíjení/vybití²⁷. Slibné možnosti se ukazují při strukturálním studiu různých epitaxních vrstev, tenkých filmů, intermediátů ve fyzikálních a chemických procesech apod. Dále jsou zajímavé strukturální studie metalokomplexů, které jsou označovány zkratkami MOF (metal-organic frameworks)^{28,29}

Tabulka I

Typická hraniční dávka elektronového svazku způsobující ztrátu krystalinity, vyjádřena jako plošná hustota elementárního náboje, σ_e . Její hodnoty pro různé sloučeniny byly stanoveny na základě zkušeností v laboratoři autora L. Palatinuse a jsou pouze přibližné

Třída	Sloučeniny	σ_e [$e/\text{Å}^2$]
1.	zeolity	>100
2.	MOF (metal organic frameworks)	5–15
3.	proteiny	1–10
4.	molekulární krystaly s H-vazbami	0,5–10
5.	molekulární krystaly s převážujícími van der Waalsovými vazbami	0,01–0,5

a COF (covalent organic frameworks)³⁰ a aperiodických materiálů, např. slitin Cu_3Si (cit.³¹) a Ni_8Ti_5 (cit.²³). Velké úspěchy slaví 3D ED při řešení struktur porézních materiálů, k nimž patří především zeolitová síta^{32,33} a to včetně zachycených organických molekul uvnitř sít³⁴ v katalytických aplikacích a potom zeolitické materiály pro sorpci CO_2 , např. chabazit³⁵.

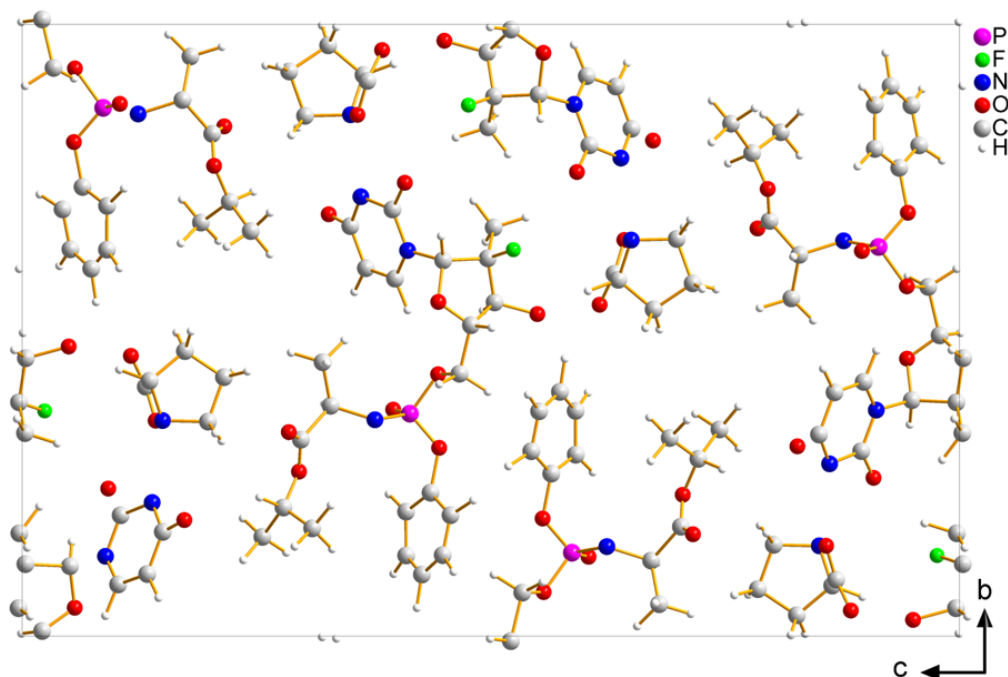
Mnoho materiálu ke studiu 3D ED předkládá mineralogie. Jedná se o strukturální studium mikroskopických fází vznikajících na fázových rozhraních nebo metamorfovaných fází ze skládek apod., kdy jsou k dispozici pouze submikronové vzorky (<1 μm), často navíc ve složitých

matricích. To se týká i fází nacházejících se v meteoritech a horninách vytvořených za extrémních podmínek a v neposlední řadě i archeologických artefaktů. Příkladem úspěšně vyřešených mineralogických struktur jsou vláknité silikáty: již zmíněný čaroit²⁵ a denisovit³⁶ (průměr vláken 200–500 nm), řada minerálů uranu^{37–39} a jiné minerály^{40–43}.

Aplikace 3D ED pro určení struktury proteinů je specifická oblast, podobně jako v RTG krystalografii, která se dělí na tzv. malou a velkou (proteinovou nebo makromolekulární) krystalografii. U makromolekulární krystalografie se jedná především o specifickou krystalizaci vzorků a jejich uchování (vitifikace, zamražení). Ze začátku byla většina struktur proteinů stanovených 3D ED pouze reprodukcí již známých struktur stanovených RTG difrakcí. V posledních letech se začínají objevovat 3D ED práce analyzující dosud neřešené struktury, např.^{44–46}. Při stanovení struktury proteinů se fázový problém (experimentální nedostupnost fází difrakcí nutných pro výpočet map elektronové hustoty) řeší metodou „molecular replacement“ (molekulární nahrazení nebo lépe molekulární podobnost). Sběr dat pro 3D ED se u proteinů provádí technikou s kontinuální rotací.

3.3.1. Struktury molekulárních krystalů

Aplikační podstatou zmiňovaného grantu EXPRO (viz kap. 1) je stanovení struktury molekulárních krystalů, a proto je jim zde věnována samostatná podkapitola. Ambicí je metodu 3D ED a její možnosti dostat více do pozornosti chemiků a zvláště farmaceutických chemiků, např. na



Obr. 2. Krystalová struktura kokryystalu sofobuvir – L-prolin, vyřešená metodou 3D ED s precízí, včetně určení absolutní struktury; barevná verze obrázku je dostupná na webových stránkách časopisu Chemické listy

strukturním studiu cyklických peptidů, kalixarenů, fluoro- vaných derivátů a potom na molekulárních krystalech ve farmaceutických aplikacích.

Současný farmaceutický výzkum široce využívá metodu SCXRD pro strukturní studie molekulárních krystalů (substancí, nečistot, intermediátů apod.). Problémem však je, že některé látky krystalují špatně, tzn. v submikroskopických krystalech nevhodného tvaru (vlákna, lístečky, krystaly typu kniha apod.) nebo v nedokonalých krystalech vznikajících např. na fázových rozhraních. Permanentním problémem farmaceutického průmyslu je také polymorfismus substancí a jejich neočekávané polymorfní přechody¹. Důležité je proto provést strukturní studie polymorfních přechodů již v nukleačním stádiu a potom v komplexních maticích, např. v tabletě nebo tobolece. V poslední době jsou předmětem výzkumu ve farmacii kokrystaly. Hranice mezi kategoriemi farmaceutický kokrystal vs. farmaceutická sůl je difuzní a může být i předmětem soudního sporu. Uznávaným kritériem pro jednoznačné zařazení substance do správné kategorie je stanovení polohy protonu (vodíku) mezi donorem a akceptorem. Je známo, že se stanovením polohy protonu má někdy SCXRD problémy. Pro farmacii je klíčová znalost absolutní struktury a z ní vyplývající chirální čistota substancí, kterou si žádný farmaceutický výrobce dnes nedovolí ignorovat. Metoda SCXRD je schopna stanovit absolutní strukturu spolehlivěji, když struktura obsahuje těžký atom.

Ve všech těchto farmaceutických aplikacích se s úspěchem může uplatnit i 3D ED. Dokonce v porovnání s SCXRD umí metoda 3D ED, v kombinaci s dynamickým upřesněním, snáze a spolehlivěji stanovit absolutní strukturu, i když ji tvoří pouze lehké atomy⁴⁷. Dalšími ukázkami farmaceutických aplikací 3D ED jsou stanovení struktury aktivní substance přímo v lékové formě – tvrdé tobolece přípravku Grippostad® (cit.⁴⁸) a strukturní studium rychlých polymorfních transformací glycinu⁴⁹. Příklady vyřešených farmaceutických struktur v Laboratoři elektronové krystalografie Fyzikálního ústavu AV ČR jsou paracetamol, polymorf II (cit.²¹) a kokrystal sofosbuvir – L-prolin (obr. 2)⁴⁷.

4. Závěr

V dohledné době 3D ED určitě nenahradí rutinní a široce používanou RTG difrakci. Ovšem tam, kde se dostává metoda SCXRD do problémů (velikost monokrystalu, jeho existence v komplexní matici), má metoda 3D ED bezpochyby velký potenciál rozvoje. K výhodě 3D ED patří fakt, že silná Coulombova interakce mezi dopadajícími elektrony a hmotou krystalu umožňuje dobrý poměr signálu k šumu i u velmi tenkých vzorků a tím snadnější identifikaci lehkých atomů, jako je lithium a vodík, ve srovnání s RTG difrakci. Absolutní strukturu umí 3D ED stanovit spolehlivěji.

Na druhé straně však současná 3D ED trpí slabinami. Řešení některých z nich je tématem zmiňovaného grantu GA EXPRO:

- potřeba dalšího vývoje metod sběru přesných a úplných dat,
- nedostatečná přesnost v určení mřížkových parametrů,
- rozlišení mezi atomy s podobnou rozptylovou silou je obtížné (např. Si a Al),
- přesnost stanovení délek a úhlů chemických vazeb není dostatečná, a tak nelze rozlišit např. jednoduchou vazbu C–O od dvojně C=O,
- stanovení absolutní struktury je zatím spolehlivé pouze pro enantiocisté sloučeniny,
- analyzovat efekty polarizace chemické vazby apod. pomocí 3D ED dat je teoreticky možné, ale prakticky dosud neprozkoumané a neověřené.

Kromě toho nelze pominout fakt, že současné experimentální zařízení pro 3D ED je primárně postaveno jako TEM mikroskop a měření elektronové difrakce je pouze jeden z jeho režimů. Ve vývoji jsou ovšem přístroje specializované pro sběr 3D ED dat a jejich automatické zpracování, což metodu elektronové difrakce učiní dostupnější široké obci chemiků a krystalografů.

Seznam zkratek

ADT	automated diffraction tomography
COF	covalent organic frameworks
DOF	degrees of freedom
3D ED	three-dimensional electron diffraction
MicroED	Microcrystal electron diffraction
MOF	metal organic frameworks
NMR	nuclear magnetic resonance
PXRD	powder X-ray diffraction
PEDT	precession-assisted electron diffraction tomography
RED	rotation electron diffraction
SCXRD	single crystal X-ray diffraction
XRD	X-ray diffraction

Tato práce byla podpořena GA ČR, projektem excellence v základním výzkumu EXPRO 21-05926X.

LITERATURA

1. Kratochvíl B., Hušák M., Korotkova E., Jegorov A.: Chem. Listy 110, 40 (2016).
2. Urbanová M., Czernek J., Brus J.: Chem. Listy 112, 522 (2018).
3. Groom C. R., Bruno I. J., Lightfoot M. P., Ward C. A.: Acta Crystallogr. B 72, 171 (2016).
4. Hašek J.: Mater. Struct. 27, 73 (2020).
5. Dejoie C., McCusker L. B., Baerlocher C., Abela R., Patterson B. D., Kunz M., Tamura N.: J. Appl. Crystallogr. 46, 791 (2013).
6. Smeets S., Zou X., Wan W.: Acta Crystallogr. A 72, 106 (2016).
7. Kimura F., Oshima W., Matsumoto H., Uekusa H., Aburaya K., Masataka Maeyama M., Kimura T.: CrystEngComm 16, 6630 (2014).
8. Vainshtein B. K.: *Structure Analysis by Electron Diffraction*. Pergamon Press, Oxford 1964.

9. Dorset D. L.: *Acta Crystallogr. B* 52, 753 (1996).
10. Kolb U., Gorelik T., Otten M. T.: *Ultramicroscopy* 108, 763 (2008).
11. Weirich T. E., Zou X., Ramlau R., Simon A., Cascarano G. L., Giacomuzzo C., Hovmöller S.: *Acta Crystallogr. A* 56, 29 (2000).
12. Gonen T., Cheng Y., Sliz P., Hiroaki Y., Fujiyoshi Y., Harrison S. C., Walz T.: *Nature* 438, 633 (2005).
13. Gemmi M., Mugnaioli E., Gorelik T. E., Kolb U., Palatinus L., Boullay P., Hovmöller S., Abrahams J. P.: *ACS Cent. Sci.* 5, 1315 (2019).
14. Mugnaioli E., Gorelik T., Kolb U.: *Ultramicroscopy* 109, 758 (2009).
15. Wan W., Sun J., Su J., Hovmöller S., Zou X.: *J. Appl. Crystallogr.* 46, 1863 (2013).
16. Gemmi M., La Place M. G. I., Galanis A. S., Rauch E. F., Nicolopoulos S.: *J. Appl. Cryst.* 48, 718 (2015).
17. Plana-Ruiz S., Krysiak Y., Portillo J., Alig E., Estradé S., Peiró F., Kolb U.: *Ultramicroscopy* 211, 112951 (2020).
18. Ångström J., Chen H., Wan W.: *J. Appl. Crystallogr.* 51, 982 (2018).
19. Clabbers M. T. B., Gruene T., Parkhurst J. M., Abrahams J. P., Waterman D. G.: *Acta Crystallogr. D* 74, 506 (2018).
20. Palatinus L., Petříček V., Corrêa C. A.: *Acta Crystallogr. A* 71, 235 (2015).
21. Palatinus L., Brázda P., Jelínek M., Hrdá J., Steciuk G., Klementová M.: *Acta Crystallogr. B* 75, 512 (2019).
22. Palatinus L., Brázda P., Boullay P., Perez O., Klementová M., Petit S., Eigner V., Zaarour M., Mintová S.: *Science* 355, 166 (2017).
23. Klementová M., Karlík M., Novák P., Palatinus L.: *Intermetallics* 85, 110 (2017).
24. Steciuk G., Majzlan J., Plášil J.: *IUCrJ* 8, 116 (2021).
25. Rozhdestvenskaya I. V., Mugnaioli E., Czank M., Depmeier W., Kolb U., Reinholdt A., Weirich T.: *Mineral. Mag.* 74, 159 (2010).
26. Baraldi A., Buffagni E., Capelletti R., Mazzerà M., Fasoli M., Lauria A., Moretti F., Vedda A., Gemmi M.: *J. Phys. Chem. C* 117, 26831 (2013).
27. Karakulina O. M., Demortiere A., Dachraoui W., Abakumov A. M., Hadermann J.: *Nano Lett.* 18, 6286 (2018).
28. Yuan S. a 14 spoluautorů: *ACS Cent. Sci.* 4, 105 (2018).
29. Feyand M., Mugnaioli E., Vermoortele F., Bueken B., Dieterich J. M., Reimer T., Kolb U., de Vos D., Stock N.: *Angew. Chem., Int. Ed.* 51, 10373 (2012).
30. Zhang Y. B., Su J., Furukawa H., Yun Y., Gándara F., Duong A., Zou X., Yaghi O. M.: *J. Am. Chem. Soc.* 135, 16336 (2013).
31. Palatinus L., Klementová M., Dřínek V., Jarošová M., Petříček V.: *Inorg. Chem.* 50, 3743 (2011).
32. Martínez-Franco R., Moliner M., Yun Y., Sun J., Wan W., Zou, X., Corma A.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 110, 3749 (2013).
33. Guo P., Shin J., Greenaway A. G., Min J. G., Su J., Choi H. J., Liu L., Cox P. A., Hong S. B., Wright P. A., Zou X.: *Nature* 524, 74 (2015).
34. Wang B., Rhauderwiek T., Inge A. K., Xu, H., Yang, T., Huang Z., Stock N., Zou X.: *Chem. - Eur. J.* 24, 17429 (2018).
35. Debost M., Klar P. B., Barrier N., Clatworthy E. B., Grand J., Laine F., Brazda P., Palatinus L., Nesterenko N., Boullay P., Mintova S.: *Angew. Chem., Int. Ed.* 59, 23491 (2020).
36. Rozhdestvenskaya I. V., Mugnaioli E., Schowalter M., Schmidt M. U., Czank M., Depmeier W., Rosenauer A.: *IUCrJ* 4, 223 (2017).
37. Plášil J., Palatinus L., Rohlíček J., Houdková L., Klementová M., Goliáš V., Škácha P.: *Am. Mineral.* 99, 276 (2014).
38. Steciuk G., Skoda R., Rohlíček J., Plasil J.: *J. Geosci.* 65, 15 (2020).
39. Steciuk G., Ghazisaeed S., Kiefer B., Plasil J.: *RSC Adv.* 9, 19657 (2019).
40. Lanza A. E., Gemmi M., Bindi L., Mugnaioli E., Paar W. H.: *Acta Crystallogr. B* 75, 711 (2019).
41. Mugnaioli E., Bonaccorsi E., Lanza A. C., Elkaim E., Diez-Gomez V., Sobrados I., Gemmi M., Gregorkiewicz M.: *IUCrJ* 7, 1070 (2020).
42. Fritz J., Greshake A., Klementova M., Wirth R., Palatinus L., Trønnes R. G., Fernandes V. A., Böttger U., Ferrière L.: *Am. Mineral.* 105, 1704 (2020).
43. Steciuk G., Palatinus L., Rohlíček J., Ouhenia S., Chateigner D.: *Sci. Rep.* 9, 9156 (2019).
44. Lanza A., Margheritis E., Mugnaioli E., Cappello V., Garau G., Gemmi M.: *IUCrJ* 6, 178 (2019).
45. Martynowycz M. W., Khan F., Hattne J., Abramson J., Gonen T.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 117, 32380 (2020).
46. Xu H., Lebrette H., Clabbers M. T. B., Zhao J., Griese J. J., Zou X., Högbom M.: *Sci. Adv.* 5, eaax4621 (2019).
47. Brázda P., Palatinus L., Babor M.: *Science* 364, 667 (2019).
48. Gruene T. a 17 spoluautorů: *Angew. Chem., Int. Ed.* 57, 16313 (2018).
49. Broadhurst E. T., Hongyi Xu, Clabbers M. T., Lightowler M., Nudelman F., Zoub X., Parson S.: *IUCrJ* 7, 5 (2020).

L. Palatinus^a and B. Kratochvíl^b (^a *Department of Structure Analysis, Institute of Physics of the Czech Academy of Sciences,* ^b *Department of Solid State Chemistry, University of Chemistry and Technology Prague*): **Electron Diffraction – New Tool for Crystal Structure Solutions**

X-ray single crystal diffraction analysis is currently the most used method for determining the structure of substances. In the last 15 years, however, 3D electron diffraction has developed rapidly as a competitive method of structural analysis. Compared to X-ray single crystal anal-

ysis, the input crystal size for 3D electron diffraction is 2–3 orders of magnitude smaller, and structural analysis can also be performed in a complex matrix. In addition, data collection takes from seconds to minutes for 3D electron diffraction, compared to hours for X-ray diffraction. Although 3D electron diffraction is not yet a precise and routine technique, it has great application potential for chemists. The goal of this review is to provide a brief insight of the principles of 3D electron diffraction, experimental design, data collection and structural evaluation. Emphasis is placed on illustrating structural applications in the fields of inorganic, organic, metalloorganic compounds, metals and alloys, aperiodic crystals, zeolite sieves, minerals, proteins and pharmaceutical substances.

English translation available in the on-line version.

Keywords: transmission electron microscope, 3D electron diffraction, structural analysis, nanocrystal, molecular crystal

Acknowledgements

The development of the structural methodology of 3D electron diffraction in the Czech Republic was supported by a EXPRO grant of the Czech Science Foundation (EXPRO 21-05926X).

ELECTRON DIFFRACTION – A NEW TOOL FOR CRYSTAL STRUCTURE SOLUTIONS

LUKÁŠ PALATINUS^a and BOHUMIL KRATOCHVÍL^b

^a Department of Structure Analysis, Institute of Physics, Academy of Sciences of the Czech Republic, Cukrovarnická 10/112, 162 00 Prague 6, ^b Department of Solid State Chemistry, University of Chemistry and Technology Prague, Technická 5, 166 28 Prague 6

Received 15.3.21, accepted 27.5.21.

Keywords: transmission electron microscope, 3D electron diffraction, structural analysis, nanocrystal, molecular crystal

Content

1. Introduction
2. Diffraction
3. Electron diffraction
 - 3.1. Experimental set-up and data collection
 - 3.2. Data evaluation
 - 3.3. Application
 - 3.3.1. Molecular crystal structures
4. Conclusion

1. Introduction

The determination of the structure of molecules and their arrangement in a crystal, including binding interactions, is key to understanding many chemical and biological processes, e.g. the mechanism of action of drugs, vitamins, toxins and other substances in the body, the effect of catalysts in chemical technology or biocatalysts (enzymes) in the human body, or the effect of environmental contaminants on the environment, etc. Chemists use two main techniques to determine the structure of molecules and crystals: X-ray diffraction (XRD) and nuclear magnetic resonance (NMR). Both are based on crystalline starting material, which is reflected in the names of the fields: X-ray crystallography¹ and NMR crystallography². These methods are complementary in certain situations, although solid-state NMR spectroscopy, despite rapid application development, is not an alternative capable of competing with routine X-ray diffraction techniques.

Since 1965, the solved structures of organic and organometallic molecular crystals have been deposited in the largest crystallographic database CSD (The Cambridge Structural Database)³, which in 2020 contained more than 1 million experimentally determined structures. The vast

majority of these structures have been determined by X-ray diffraction (>95%) and the remainder by NMR, neutron and electron diffraction techniques⁴.

Classical X-ray structural analysis (SCXRD, see list of abbreviations) is performed on a single crystal of the substance under investigation. For successful data collection, it is sufficient to irradiate a volume of the order of 0.01 mm³ of the single-crystal material with a monochromatic X-ray beam. Growing such a single crystal is achievable for about 90% of organic and inorganic compounds, and thus over more than a century of existence, single crystal X-ray structural analysis has evolved into a precise technique with advanced and automated data acquisition and fast solution algorithms. Today, it takes hours to completely measure and solve a single crystal structure.

However, about 10% of the substances crystallize very reluctantly or only as microcrystalline powder (grain size on the order of 0.01 mm or less). These are e.g. products of solid-state chemical reactions. A separate discipline is the crystallisation of proteins, for which single crystals with a maximum size of 10⁻¹ to 10⁻² mm are achievable. However, the primary product of many industries (e.g. pharmaceutical industry) are microcrystalline powders and here it is the primary material that needs to be analyzed, because when it is recrystallized into a single crystal for SCXRD, there is a risk of formation of another phase (e.g. another polymorph or solvate).

The limiting problem of the size of the input single crystal to be measured can be addressed in X-ray crystallography in several ways. In the last 20 years, the solution of the structure from polycrystalline (powder) materials has been developing rapidly. Here, however, there are limitations in the lower accuracy of the achieved solution compared to the single crystal, the absolute structure and the positions of the hydrogen atoms are unattainable and, in addition, the computation time required to solve the structure increases exponentially with the degree of internal flexibility of the molecule (the number of so-called DOF parameters – degrees of freedom). Another approach is the use of intense synchrotron radiation in the X-ray region, which can be used to obtain high quality diffraction data from microcrystals with boundary dimensions of 5–10 μm (e.g. proteins or microcrystals separated from powder). This technique also has its limitations, as many substances cannot withstand irradiation with an intense synchrotron beam. In addition, the synchrotron is an exceptional facility that is not readily available to most researchers. Interesting developments are the measurement using the technique of Serial Snapshot Crystallography on a synchrotron⁵ or by electron diffraction⁶ and then diffraction on a pseudosingle crystal composed of Magnetically Oriented Microcrystal Arrays (MOMA)⁷.

Technique named 3D electron diffraction (3D ED) is gradually becoming a relatively new application method and another player in the field of structural analysis, for which a small amount of input material (nanocrystal) is sufficient. Although a number of problems associated with it are still to be solved, it has great potential for development. It will certainly become more and more interesting for chemists and its development in the Czech Republic was therefore supported by the Czech Science Foundation, EXPRO project: "Nanocrystallography of molecular crystals" (researcher Dr. ret. nat. Lukáš Palatinus from the Academy of Sciences of the Czech Republic). It is a six-year project and its solution started in 2021. It aims to develop a set of tools, methods and programs with the ambition to set new standards in the field of electron crystallography of molecular crystals and to turn this method into a fully developed and generally accepted tool for the analysis of nano- and microcrystalline molecular materials.

2. Diffraction

In physical terms, diffraction is the scattering of probing radiation at scattering centers (obstacles) and the subsequent interference of the scattered beams. This means that energy scattered by an obstacle only propagates in certain directions. If the probing radiation has a wavelength comparable to or less than the distance between the scattering centres (e.g. atoms in a crystal structure irradiated by monochromatic X-rays from a laboratory X-ray tube Cu K α : $\lambda = 154$ pm), then the diffraction experiment results in a diffraction pattern in which information about the three-dimensional internal arrangement of the atoms in the material is encoded.

3. Electron diffraction

Because of the wave properties of elementary particles (Louis de Broglie, 1924), electron and neutron beams incident on crystals also exhibit diffraction. If the electrons have an energy of 50–200 eV, they do not penetrate the volume of the crystal but are reflected back from the atoms on the surface. These so-called slow electrons are used in the LEED (Low Energy Electron Diffraction) method to study the surface of materials, especially to identify the phases present. Phase identification is also possible by powder X-ray diffraction (PXRD) analysis, although this requires a larger amount of input material than LEED. At significantly higher incident electron energies, roughly from the first tens of keV onwards, relativistic electrons can illuminate a thin layer of the substance under investigation, e.g. a nanocrystal, diffract and provide analysable diffraction data, i.e. diffraction intensities and their positions, from which the crystal structure can be determined.

The electron diffraction method for structural applications has been known for a relatively long time, see the pioneering work of Vainshtein⁸ and then Dorset⁹. However, it is not yet as sophisticated and automated technique as

the current SCXRD and is not routinely available to the general chemical community. In the last 15 years, however, it has been developing rapidly despite the fact that the electron diffraction phenomenon is fundamentally more complicated than X-ray diffraction in terms of analytical use. The work of Kolb¹⁰, Hovmöller and Zou¹¹, Gonen¹² and co-workers has contributed to a wider awareness of 3D ED among chemists and biochemists, showing that the technique can be successfully used to determine the structure of inorganic and organic compounds, metal complexes and protein structures. The current state of the art of 3D ED is summarised in the review by Gemmi et al¹³.

3.1. Experimental setup and data collection

The 3D ED experiment is performed on a transmission electron microscope (TEM). In the diffraction mode of the microscope, data are collected from a nanocrystal of a substance (volume $1-10^{-4}$ μm^3). The size of the nanocrystal is matched to the width of the probing electron beam, which ranges from units of nm to a few μm . Compared to X-ray single crystal analysis, the required crystal size for 3D ED is 2–3 orders of magnitude smaller, which is very significant in terms of sample preparation and availability.

In the stationary electron beam method, the 3D ED data set is a sequence of diffraction patterns recorded sequentially at different tilt angles of the TEM goniometer or sample. However, the pole attachments of the objective lens limit the tilt angles so that their range does not usually exceed $120^\circ (\pm 60^\circ)$. However, this missing wedge in the ED diffraction space can be filled either by crystal symmetry or by collecting data from multiple crystals with different orientations. The problem with stationary data acquisition is that it does not cover the regions of reciprocal space between the stationary images.

This problem can be solved by collecting data in precession mode. In this mode, the electron beam performs a precession motion with a cone peak on the sample and a peak angle of typically $0.5-2^\circ$. This precession motion ensures the collection of integrated diffracted intensities (Fig. 1). This method is referred to as precession electron diffraction tomography (PEDT)¹⁴ or 3D ED with precession. Another option to solve the problem of gaps between stationary diffraction patterns is rotational electron diffraction (RED)¹⁵, which uses fine beam tilt steps achieved by deflection coils in the TEM, or the continuous rotation method (also referred to as c-RED, IEDT or MicroED), which involves exposure of the detector while the crystal rotates around the goniometer axis. However, data acquisition techniques in ED are rapidly evolving¹³. Depending on the data acquisition method and the sensitivity of the detector, it takes on the order of tens of seconds to approx. 20 minutes to record data from a nanocrystal. This is considerably shorter than is common in SCXRD, although experiment times are evolving and shortening here as well. The result of a 3D ED (and SCXRD) experiment is a file containing typically several thousand to tens of thousands of reflections.

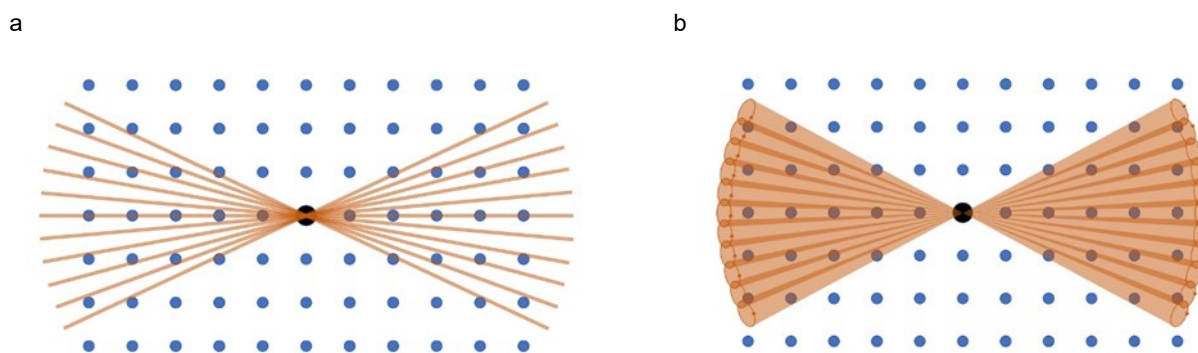


Fig. 1. Schematic representation of data acquisition by stationary beam method (a) and in precession mode (b). Blue dots: points of the reciprocal lattice. Orange areas: the region of reciprocal space covered by a single diffraction pattern. The precession motion in figure (b) is indicated by ellipses with arrows. The angular ranges of the regions covered by the precession motion may overlap.

Nanocrystals measured by ED are of course very sensitive to any mechanical instability of the TEM goniometer, which can easily move the sample out of the irradiated area. The stability of the mechanical motion of the goniometer is usually insufficient to use this motion to keep the crystal in the electron beam. It is much easier to move the beam to follow the movement of the crystal. This can be done in two ways. The first way is to always take an image of the crystal after a few degrees of rotation and move the electron beam according to its displacement. The second option is to first map the motion of the crystal and then move the beam according to this pre-determined trajectory during the actual experiment^{16,17}.

3.2. Data evaluation

The protocols in 3D ED ensure optimal collection of integrated diffraction intensities and their positions. There are a number of data reduction software packages specifically designed for 3D ED or adapted from software for X-ray diffraction data. However, there are two important differences in 3D ED compared to X-ray diffraction:

i) The diffraction positions on the detector are inaccurate for 3D ED:

The inaccuracy of the diffraction positions is due to the presence of many optical elements in the electron microscope between the sample and the detector. This translates into inaccuracy in the determination of the lattice parameters. This inaccuracy can reach up to several percent in the determination of the elementary cell edge length and up to one degree in the interaxial angle. The accuracy of the determination of lattice parameters is currently up to 20 times better with SCXRD. There is room for solving this problem, although the so far proposed solutions are still insufficient^{18,19}.

ii) Multiple electron scattering in the material under investigation:

Unlike X-ray photons, electrons carry a negative charge and therefore their interaction with atoms in the crystal is several orders of magnitude stronger. This results

in multiple scattering of electrons in the material. This situation is known in physics as dynamic diffraction. In contrast, in X-ray diffraction, multiple scattering almost does not occur and such case the simpler, so-called kinematic theory of diffraction applies.

The intensities and positions of the diffractions in ED are further processed by procedures analogous to SCXRD. This means refinement of lattice parameters, calculation and refinement of atomic positions and other parameters, and calculation of electrostatic potential maps. Two approaches are used to refine structures from 3D ED data. Either multiple scattering is ignored and kinematic diffraction theory is used to calculate the model intensities. This is only a rough approximation, which leads to reduced accuracy of the results and increased values of R-factors (a criterion for the correctness of structure determination; the higher the R-factor values, the less reliable the refined structure model). An alternative is to calculate the model intensities using dynamic diffraction theory. This approach is called dynamical refinement²⁰ and its advantages have been demonstrated on the solution of structures of a variety of materials^{21–24}. However, even dynamic refinement has shortcomings, because in its current implementation it does not consider defects and imperfections in crystals. These play a more significant role in the dynamical diffraction case than in the kinematic case.

3.3. Applications

The first application studies of 3D ED were carried out with a stationary beam on inorganic materials that are stable, e.g. the mineral charotite²⁵. Afterwards, applications were extended to other types of compounds and more recently to pharmaceutical molecular crystals and biological structures (proteins). However, molecular crystals and proteins are much less stable and easily decompose under a stationary beam (Table I). The main advantage of 3D ED is the tiny input sample (sizes of 10–10² nm) and then the attractive possibility of structural identification of individual particles (grains) in compact matrices without the need

Table I

Typical limiting electron beam dose causing loss of crystallinity, expressed as area elemental charge density, σ_e . Its values for various compounds have been determined on the basis of experience in the laboratory of the author L. Palatinus and are just indicative

Class	Compounds	σ_e [e/Å ²]
1.	zeolites	>100
2.	MOFs (metal organic frameworks)	5–15
3.	proteins	1–10
4.	molecular crystals with H-bonds	0,5–10
5.	molecular crystals with predominant van der Waals bonds	0,01–0,5

for their separation. This is difficult to do with SCXRD. Measurement techniques, measurement modes, and data evaluation algorithms are improving rapidly in ED.

In materials research, applications involve e.g. phase transitions at the level of individual grains and precipitates, see the structure of the Eu₂Si₂O₇ phase in a quartz matrix²⁶. The structural study of electrode material in Li-ion batteries *in-situ* during charging/discharging is also interesting²⁷. Promising possibilities are shown in the structural study of various epitaxial layers, thin films, intermediates in physical and chemical processes, etc. Furthermore, structural studies of metal-organic frameworks (MOFs)^{28,29}

and covalent organic frameworks (COFs)³⁰ and aperiodic materials such as Cu₃Si alloys³¹ and Ni₈Ti₅ (ref.²³) are of interest. 3D ED has been very successful in addressing the structures of porous materials, which include primarily zeolite sieves^{32,33} including trapped organic molecules³⁴ in catalytic applications and then zeolitic materials for CO₂ sorption, e.g. chabazite³⁵.

Mineralogy presents a lot of material for the study by 3D ED. The applications in mineralogy involve the study of microscopic phases formed at phase interfaces or metamorphosed phases from dumps etc., where only submicron samples (<1 μm) are available, frequently embedded in complex matrices. This also applies to phases found in meteorites and rocks formed under extreme conditions, and not least to archaeological artefacts. Examples of successfully solved mineralogical structures are fibrous silicates: the mentioned charoite²⁵ and denisovite³⁶ (fibre diameter 200–500 nm), a number of uranium minerals^{37–39} and other phases^{40–43}.

The application of 3D ED for protein structure determination is a specific field, similar to X-ray crystallography, which is divided into small and large (protein or macromolecular) crystallography. In macromolecular crystallography, it is mainly concerned with the specific crystallization of samples and their preservation (vitrification, freezing). In the beginning, most of the protein structures determined by 3D ED were only reproductions of already known structures determined by X-ray diffraction. In recent years, 3D ED work analyzing previously unresolved

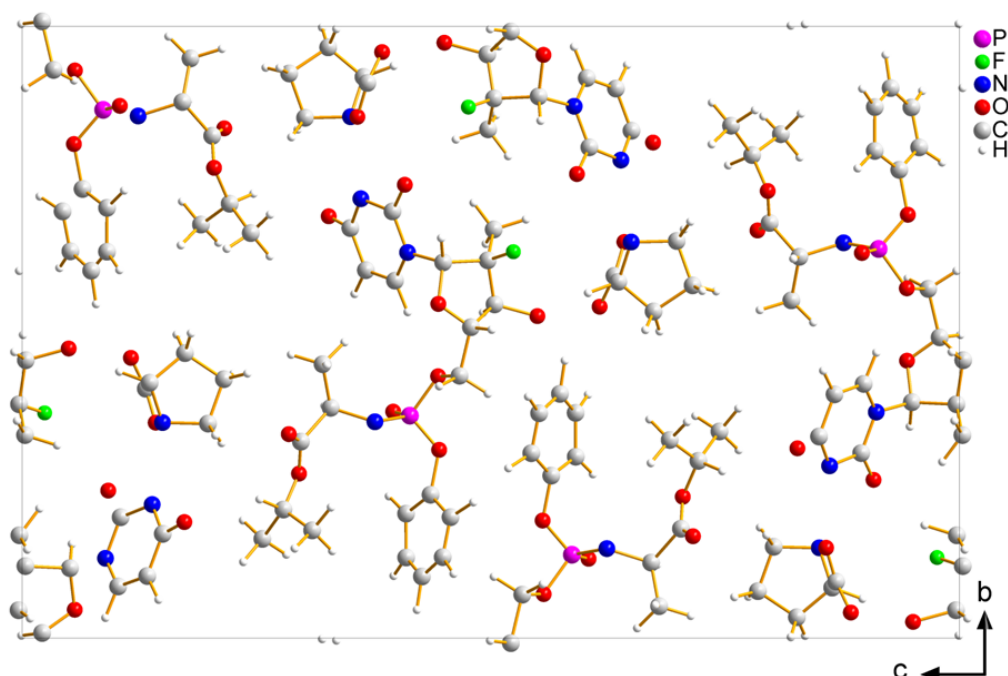


Fig. 2. Crystal structure of the sofosbuvir – L-proline cocrystal solved by 3D ED with precession, including the determination of the absolute structure

structures started to appear, e.g.^{44–46}. In protein structure determination, the phase problem (experimental unavailability of diffraction phases necessary for the calculation of electron density maps) is solved by the molecular replacement method. Data acquisition for 3D ED is performed for proteins using a continuous rotation technique.

3.3.1. Molecular crystal structures

The application basis of the mentioned EXPRO project (see Chapter 1) is the determination of the structure of molecular crystals and therefore a separate subsection is devoted to them here. The ambition is to bring the 3D ED method and its possibilities more to the attention of chemists and especially pharmaceutical chemists, e.g. on structural studies of cyclic peptides, calixarenes, fluorinated derivatives and then on molecular crystals in pharmaceutical applications.

Current pharmaceutical research is widely using the SCXRD method for structural studies of molecular crystals (substances, impurities, intermediates, etc.). However, the problem is that some substances crystallize poorly, i.e. in submicroscopic crystals of inappropriate shape (filaments, leaflets, book-like crystals, etc.) or in imperfect crystals formed e.g. at phase interfaces. Polymorphism of substances and their unexpected polymorphic transitions is also a permanent problem in the pharmaceutical industry¹. It is therefore important to perform structural studies of polymorphic transitions already at the nucleation stage of crystallization process and then in complex matrices, e.g. in a tablet or capsule. Recently, cocrystals have been the subject of research in pharmaceuticals. The boundary between the categories of pharmaceutical cocrystal vs. pharmaceutical salt is diffuse and can be the subject of litigation. A recognised criterion for clearly classifying a substance into the correct category is the determination of the position of the proton (hydrogen) between the donor and acceptor. It is known that SCXRD sometimes has problems with determining the accurate position of the proton. Knowledge of the absolute structure and the resulting chiral purity of substances is crucial for pharmaceuticals, which no pharmaceutical manufacturer today can afford to ignore. The SCXRD method is able to determine the absolute structure more reliably when the structure contains a heavy atom.

In all these pharmaceutical applications, 3D ED can be successfully applied. Even compared to SCXRD, 3D ED, in combination with dynamic refinement, can more easily and reliably determine the absolute structure even when it consists of only light atoms⁴⁷. Other examples of pharmaceutical applications of 3D ED are the determination of the structure of the active substance directly in the dosage form – the hard capsule of Grippostad® (ref.⁴⁸) and the structural study of rapid polymorphic transformations of glycine⁴⁹. Examples of solved pharmaceutical structures in the Laboratory of Electron Crystallography of the Institute of Physics of the Czech Academy of Sciences are e.g. paracetamol, polymorph II (ref.²¹) and cocrystal sofosbuvir – L-proline (Fig. 2)⁴⁷.

4. Conclusion

3D ED will certainly not replace routine and widely used X-ray diffraction in the foreseeable future. However, where the SCXRD method runs into problems (single crystal size, its existence in a complex matrix), the 3D ED method undoubtedly has great potential for development. One of the advantages of 3D ED is that the strong Coulomb interaction between the incident electrons and the crystal mass allows a good signal-to-noise ratio even for very thin samples, making it easier to identify light atoms such as lithium and hydrogen compared to X-ray diffraction. The absolute structure can be determined more reliably by 3D ED.

On the other hand, the current 3D ED suffers from weaknesses. Addressing some of these is the subject of the EXPRO project mentioned above:

- The need for further development of methods to collect accurate and complete data,
- the lack of accuracy in the determination of lattice parameters,
- differentiation between atoms with similar scattering strength is difficult (e.g. Si and Al),
- the accuracy of the determination of the lengths and angles of chemical bonds is not sufficient, so that it is not possible to distinguish e.g. a single C–O bond from a C=O double bond,
- the determination of the absolute structure is so far only reliable for enantiopure compounds,
- analysing chemical bond polarity effects etc. using 3D ED data is theoretically possible, but practically unexplored and untested.

In addition, one cannot ignore the fact that the current experimental setup for 3D ED is primarily built as a TEM microscope and electron diffraction measurement is only one of its modes. However, dedicated instruments for collecting 3D ED data and processing them automatically are under development, which will make the electron diffraction method more accessible to a wide community of chemists and crystallographers.

List of abbreviations

ADT	automated diffraction tomography
COFs	covalent organic frameworks
DOF	degrees of freedom
3D ED	three-dimensional electron diffraction
MicroED	Microcrystal electron diffraction
MOFs	metal organic frameworks
NMR	nuclear magnetic resonance
PXRD	powder X-ray diffraction
PEDT	precession-assisted electron diffraction tomography
RED	rotational electron diffraction
SCXRD	single crystal X-ray diffraction
XRD	X-ray diffraction

This work was supported by the Czech Science Foundation, project number 21-05926X.

REFERENCES

1. Kratochvíl B., Hušák M., Korotkova E., Jegorov A.: *Chem. Listy* 110, 40 (2016).
2. Urbanová M., Czernek J., Brus J.: *Chem. Listy* 112, 522 (2018).
3. Groom C. R., Bruno I. J., Lightfoot M. P., Ward C. A.: *Acta Crystallogr. B* 72, 171 (2016).
4. Hašek J.: *Mater. Struct.* 27, 73 (2020).
5. Dejoie C., McCusker L. B., Baerlocher C., Abela R., Patterson B. D., Kunz M., Tamura N.: *J. Appl. Crystallogr.* 46, 791 (2013).
6. Smeets S., Zou X., Wan W.: *Acta Crystallogr. A* 72, 106 (2016).
7. Kimura F., Oshima W., Matsumoto H., Uekusa H., Aburaya K., Masataka Maeyama M., Kimura T.: *CrystEngComm* 16, 6630 (2014).
8. Vainshtein B. K.: *Structure Analysis by Electron Diffraction*. Pergamon Press, Oxford 1964.
9. Dorset D. L.: *Acta Crystallogr. B* 52, 753 (1996).
10. Kolb U., Gorelik T., Otten M. T.: *Ultramicroscopy* 108, 763 (2008).
11. Weirich T. E., Zou X., Ramlau R., Simon A., Cascarano G. L., Giacobozzo C., Hovmöller S.: *Acta Crystallogr. A* 56, 29 (2000).
12. Gonen T., Cheng Y., Sliz P., Hiroaki Y., Fujiyoshi Y., Harrison S. C., Walz T.: *Nature* 438, 633 (2005).
13. Gemmi M., Mugnaioli E., Gorelik T. E., Kolb U., Palatinus L., Boullay P., Hovmöller S., Abrahams J. P.: *ACS Cent. Sci.* 5, 1315 (2019).
14. Mugnaioli E., Gorelik T., Kolb U.: *Ultramicroscopy* 109, 758 (2009).
15. Wan W., Sun J., Su J., Hovmöller S., Zou X.: *J. Appl. Crystallogr.* 46, 1863 (2013).
16. Gemmi M., La Place M. G. I., Galanis A. S., Rauch E. F., Nicolopoulos S.: *J. Appl. Cryst.* 48, 718 (2015).
17. Plana-Ruiz S., Krysiak Y., Portillo J., Alig E., Estradé S., Peiró F., Kolb U.: *Ultramicroscopy* 211, 112951 (2020).
18. Ångström J., Chen H., Wan W.: *J. Appl. Crystallogr.* 51, 982 (2018).
19. Clabbers M. T. B., Gruene T., Parkhurst J. M., Abrahams J. P., Waterman D. G.: *Acta Crystallogr. D* 74, 506 (2018).
20. Palatinus L., Petříček V., Corrêa C. A.: *Acta Crystallogr. A* 71, 235 (2015).
21. Palatinus L., Brázda P., Jelínek M., Hrdá J., Steciuk G., Klementová M.: *Acta Crystallogr. B* 75, 512 (2019).
22. Palatinus L., Brázda P., Boullay P., Perez O., Klementová M., Petit S., Eigner V., Zaarour M., Mintová S.: *Science* 355, 166 (2017).
23. Klementová M., Karlík M., Novák P., Palatinus L.: *Intermetallics* 85, 110 (2017).
24. Steciuk G., Majzlan J., Plášil J.: *IUCrJ* 8, 116 (2021).
25. Rozhdestvenskaya I. V., Mugnaioli E., Czank M., Depmeier W., Kolb U., Reinholdt A., Weirich T.: *Mineral. Mag.* 74, 159 (2010).
26. Baraldí A., Buffagni E., Capelletti R., Mazzerà M., Fasoli M., Lauria A., Moretti F., Vedda A., Gemmi M.: *J. Phys. Chem. C* 117, 26831 (2013).
27. Karakulina O. M., Demortiere A., Dachraoui W., Abakumov A. M., Hadermann J.: *Nano Lett.* 18, 6286 (2018).
28. Yuan S. and 14 coauthors: *ACS Cent. Sci.* 4, 105 (2018).
29. Feyand M., Mugnaioli E., Vermoortele F., Bueken B., Dieterich J. M., Reimer T., Kolb U., de Vos D., Stock N.: *Angew. Chem., Int. Ed.* 51, 10373 (2012).
30. Zhang Y. B., Su J., Furukawa H., Yun Y., Gándara F., Duong A., Zou X., Yaghi O. M.: *J. Am. Chem. Soc.* 135, 16336 (2013).
31. Palatinus L., Klementová M., Dřínek V., Jarošová M., Petříček V.: *Inorg. Chem.* 50, 3743 (2011).
32. Martínez-Franco R., Moliner M., Yun Y., Sun J., Wan W. Zou, X., Corma A.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 110, 3749 (2013).
33. Guo P., Shin J., Greenaway A. G., Min J. G., Su J., Choi H. J., Liu L., Cox P. A., Hong S. B., Wright P. A., Zou X.: *Nature* 524, 74 (2015).
34. Wang B., Rhauderwiek T., Inge A. K., Xu, H., Yang, T., Huang Z., Stock N., Zou X.: *Chem. - Eur. J.* 24, 17429 (2018).
35. Debost M., Klar P. B., Barrier N., Clatworthy E. B., Grand J., Laine F., Brazda P., Palatinus L., Nesterenko N., Boullay P., Mintova S.: *Angew. Chem., Int. Ed.* 59, 23491 (2020).
36. Rozhdestvenskaya I. V., Mugnaioli E., Schowalter M., Schmidt M. U., Czank M., Depmeier W., Rosenauer A.: *IUCrJ* 4, 223 (2017).
37. Plášil J., Palatinus L., Rohlíček J., Houdková L., Klementová M., Goliáš V., Škácha P.: *Am. Mineral.* 99, 276 (2014).
38. Steciuk G., Skoda R., Rohlíček J., Plasil J.: *J. Geosci.* 65, 15 (2020).
39. Steciuk G., Ghazisaeed S., Kiefer B., Plasil J.: *RSC Adv.* 9, 19657 (2019).
40. Lanza A. E., Gemmi M., Bindi L., Mugnaioli E., Paar W. H.: *Acta Crystallogr. B* 75, 711 (2019).
41. Mugnaioli E., Bonaccorsi E., Lanza A. C., Elkaim E., Diez-Gomez V., Sobrados I., Gemmi M., Gregorkiewicz M.: *IUCrJ* 7, 1070 (2020).
42. Fritz J., Greshake A., Klementova M., Wirth R., Palatinus L., Trønnes R. G., Fernandes V. A., Böttger U., Ferrière L.: *Am. Mineral.* 105, 1704 (2020).
43. Steciuk G., Palatinus L., Rohlíček J., Ouhenia S., Chateigner D.: *Sci. Rep.* 9, 9156 (2019).
44. Lanza A., Margheritis E., Mugnaioli E., Cappello V., Garau G., Gemmi M.: *IUCrJ* 6, 178 (2019).
45. Martynowycz M. W., Khan F., Hattne J., Abramson J., Gonen T.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 117, 32380 (2020).
46. Xu H., Lebrette H., Clabbers M. T. B., Zhao J., Griese J. J., Zou X., Högbom M.: *Sci. Adv.* 5, eaax4621 (2019).
47. Brázda P., Palatinus L., Babor M.: *Science* 364, 667 (2019).
48. Gruene T. and 17 coauthors: *Angew. Chem., Int. Ed.*

57, 16313 (2018).

49. Broadhurst E. T., Hongyi Xu, Clabbers M. T., Lightowler M., Nudelman F., Zoub X., Parson S.: *IUCrJ* 7, 5 (2020).

Abstract

X-ray single crystal diffraction analysis is currently the most used method for determining the structure of substances. In the last 15 years, however, 3D electron diffraction has developed rapidly as a competitive method of structural analysis. Compared to X-ray single crystal analysis, the input crystal size for 3D electron diffraction is 2–3 orders of magnitude smaller, and structural analysis can also be performed in a complex matrix. In addition, data collection takes from seconds to minutes for 3D electron diffraction, compared to hours for X-ray diffraction. Although 3D electron diffraction is not yet a precise and routine technique, it has great application potential for chemists. The goal of this review is to provide a brief insight of the principles of 3D electron diffraction, experimental design, data collection and structural evaluation. Emphasis is placed on illustrating structural applications in the fields of inorganic, organic, metalloorganic compounds, metals and alloys, aperiodic crystals, zeolite sieves, minerals, proteins and pharmaceutical substances. The development of the structural methodology of 3D electron diffraction in the Czech Republic was supported by a EXPRO grant of the Czech Science Foundation.