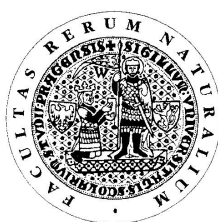


UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Klinická a toxikologická analýza



Bc. Kristýna Průchová

VIBRAČNÍ SPEKTROSKOPIE VE FARMACEUTICKÉ ANALÝZE

Vibrational spectroscopy in pharmaceutical analysis

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: Doc. RNDr. Ivan Němec, Ph.D.

Praha 2012

Tato diplomová práce vznikla v souvislosti s řešením výzkumného záměru MSM0021620857.

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

Jsem si vědoma toho, že případné využití výsledků, získaných v této práci, mimo Univerzitu Karlovu v Praze je možné pouze po písemném souhlasu této univerzity.

V Praze dne 31. srpna 2012

Poděkování

Na prvním místě bych ráda poděkovala svému školiteli panu Doc. RNDr. Ivanu Němcovi, Ph.D. za jeho bezmeznou trpělivost a odborné vedení. Neméně mé poděkování patří panu Ing. Tomáši Pekárkovi, Ph.D. za jeho vstřícnost a velmi cenné praktické rady a RNDr. Ireně Matulkové, Ph.D. za pomoc při zvládnutí techniky Ramanovy spektroskopie. V neposlední řadě bych chtěla poděkovat mé rodině a přátelům za jejich pochopení a podporu během mých studií.

ABSTRAKT

Diplomová práce se zabývá využitím vibrační spektroskopie ke studiu pevných lékových forem ve farmaceutické analýze. Povrch vzorků tablet obsahujících účinnou látku ze skupiny statinů byl studován především metodami infračervené mikrospektroskopie. Po zjištění optimálních podmínek měření byly mapy vzorků sbírány technikami spekulární reflexe, zeslabené totální reflexe (ATR) a „inverzní“ ATR. K hodnocení naměřených map bylo využito jednorozměrné analýzy a analýzy hlavních komponent. Pro srovnání byly stejné vzorky tablet měřeny i Ramanovou mikroskopií. Z naměřených map bylo určeno rozložení látek ve vzorku a také určen způsob výroby zkoumaných tablet. Porovnáním map generického a originálního léku bylo zjištěno, že se v tomto případě jednalo o granulaci. Porovnáním jednotlivých způsobů měření z hlediska výhod a nevýhod při měření a zpracování dat, byla za nejvhodnější techniku pro získání map z povrchu tablet vybrána metoda spekulární reflexe.

KLÍČOVÁ SLOVA

Infračervená mikrospektroskopie, Ramanova mikrospektroskopie, pevné lékové formy, spekulární reflexe, zeslabená totální reflexe (ATR), jednorozměrná analýza, analýza hlavních komponent

ABSTRACT

The aim of this diploma thesis is the application of vibrational spectroscopy in pharmaceutical analysis in studying solid pharmaceutical forms. The surface of tablet samples containing the active substance from the group of statins has been studied especially by the methods infrared microscopy. Spectral maps of samples were collected thanks to the techniques of specular reflection, attenuated total reflection (ATR) and "inverse" ATR after determining optimal conditions for measurements. In order to evaluate these measured maps, one-dimensional analysis and principal component analysis were used. As the same samples of tablets were also measured by Raman microscopy, the comparison has been provided. The measured distribution maps enable both a determination of substances in the sample and conclusion concerned a method of tablets' preparation. The method in this case is a granulation, which has been found out from a comparison of maps of generic and original medicament. The specular reflection method was selected to be the most appropriate technique for obtaining the maps of the surface of a tablet, via confrontation of particular methods consequently with consideration of their advantages and disadvantages in the measurement and data processing.

KEY WORDS

Infrared microspectroscopy, Raman microspectroscopy, solid pharmaceutical forms, specular reflection, attenuated total reflection (ATR), one-dimensional analysis, principal component analysis

ABSTRAKT A KLÍČOVÁ SLOVA.....	4
ABSTRACT AND KEY WORDS.....	5
1 CÍL PRÁCE	7
2 TEORETICKÁ ČÁST.....	8
2.1 Zobrazování molekul	8
2.1.1 Infračervená mikrospektroskopie	9
2.1.1.1 Metoda zrcadlového odrazu (Spekulární reflexe)	10
2.1.1.2 Metoda zeslabené totální reflexe (ATR)	10
2.1.1.3 Metoda „inverzní“ ATR	12
2.1.2 Ramanova mikrospektroskopie	13
2.2 Chemometrické postupy pro hodnocení spektrálních map.....	14
2.3 Složení a výroba tablet.....	16
2.3.1 Hypolipidemika	16
2.3.2 Pomocné látky	18
2.3.3 Pevné lékové formy.....	20
2.3.4 Polymorfismus	23
3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	24
3.1 Použitý materiál.....	24
3.2 Infračervená mikrospektroskopie.....	24
3.2.1 Instrumentace	24
3.2.2 Hledání optimálních podmínek měření	25
3.2.3 Mapování řezu tablet.....	26
3.3 Ramanova mikrospektroskopie	27
3.3.1 Instrumentace	27
3.3.2 Hledání optimálních podmínek měření	27
3.3.3 Mapování řezu tablet.....	28
4 VÝSLEDKY A DISKUZE	29
5 ZÁVĚR.....	43
SEZNAM LITERATURY	44

1 CÍL PRÁCE

Cílem předkládané diplomové práce je hodnocení technik vibrační spektroskopie - infračervené a Ramanovy mikrospektroskopie, při analýze pevných lékových forem ve farmaceutickém průmyslu. Prvním úkolem byl výběr optimálních podmínek měření pro techniky spekulární reflexe, zeslabené totální reflexe (ATR) a „inverzní“ ATR. Dalším úkolem bylo měření spektrálních map reálných vzorků tablet jednotlivými technikami infračervené mikrospektroskopie a změření stejných vzorků komplementární technikou Ramanovy mikrospektroskopie. Posledním úkolem bylo porovnání těchto technik a posouzení jejich využití v oblasti spektrálního mapování tablet.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Zobrazování molekul

Nové techniky zobrazování molekul dnes umožňují přístup i do dříve skrytých oblastí. Obecně je obraz označován za dvojrozměrný objekt, určený výškou a šířkou. Obraz, který získáme např. pomocí vibrační spektroskopie, obsahuje ještě další informace a označuje se proto 3D zobrazení. 3D zobrazení poskytuje informace o více než jednom druhu vlastností v celém objemu zkoumaného vzorku [1, 2].

Termín „zobrazování“ se používá v různých významech. V užším slova smyslu se obrazy získávají pomocí pole detektorů, kdy jsou všechny body (pixely) obrazu měřeny současně. Pokud použijeme místo pole detektorů jednobodové detektory, oblast vzorku se měří postupně a výsledek takového měření se nazývá mapa [3, 4]. Výsledkem chemického zobrazovacího experimentu, ať už mapování nebo pravého zobrazování, je chemický obraz, ve kterém jsou ideálně všechny složky analyzovaného vzorku identifikovány na základě svého chemického složení a je určena jejich poloha ve vzorku [5, 6]. Spektrální data jsou sbírána automaticky a interpretována počítačovými algoritmy [7].

Pokroky ve vývoji detektorů pro spektroskopii umožnily, aby spektrální a prostorové informace byly zaznamenávány naráz [5]. Díky tomu se metody vibrační spektroskopie, infračervená a Ramanova spektroskopie, častěji používají ke kvantitativní a kvalitativní analýze v mnoha odvětvích chemického, biochemického a farmaceutického průmyslu [8]. Infračervená spektra jsou charakterizována širokými spektrálními pásy, které se překrývají a znesnadňují tak jejich přiřazení určitým funkčním skupinám. Ramanova spektra jsou charakterizována užšími spektrálními pásy, které jsou charakteristické pro jednotlivé funkční skupiny nebo pro konkrétní vibrace meziatomových vazeb. Tvar a šířka pásů látek v pevném skupenství poskytuje důležité informace o jejich krystalové struktuře. Infračervená zobrazovací technika je schopna získat spektra potřebná k vytvoření obrazu během několika desítek minut, zatímco mapování stejné plochy vzorku pomocí Ramanovy spektroskopie může trvat několik hodin [9]. Obě metody nabízejí řadu možností pro doplnění informací o vlastnostech

farmaceutických formulací a byly použity ke studiu a objasnění struktury především tablet [5, 10].

2.1.1 Infračervená mikrospektroskopie

Spojení mikroskopie a spektroskopie poskytuje nové možnosti analýzy. Mikroskopie se zabývá zobrazováním, vytvářením a vysvětlením zvětšených obrazů. Analytická spektroskopie se zabývá emisí, odrazem a absorpcí energie záření k určení struktury a složení materiálů. Jak mikroskopie, tak spektroskopie poskytují specifické informace o složení a struktuře materiálu. Obě se zakládají na optice a interakci energie záření s látkou. Mikroskopie hraje hlavní roli ve výběru vzorku k analýze, hodnocení nejlepší spektroskopické techniky, pozorování mikrostruktury vzorku a určení oblasti pro analýzu [11]. Mikroskopy pro infračervenou spektroskopii mohou pracovat jak v transmisním, tak reflexním modu [12].

V podstatě všechna infračervená spektra jsou dnes měřena spektrometry s Fourierovou transformací [13, 14]. Obvykle jsou vybaveny DTGS (deuterovaný triglycin sulfát) detektorem, který pracuje za laboratorní teploty. Citlivost DTGS detektorů je nízká pro měření relativně slabých signálů, které přichází po nasměrování odraženého záření do malé apertury mikroskopu. Citlivější jsou MCT (mercury cadmium telluride) detektory chlazené kapalným dusíkem.

Měření reflexních spekter pomocí mikrospektrometrů je nejlepší metodou analýzy povrchů, tenkých filmů, vysoce odražejících (tj. lesklých) nebo jemně rozptýlených materiálů [15]. Díky tomu, že reflexní techniky nevyžadují téměř žádnou přípravu vzorku, staly se nejlepší volbou pro nedestruktivní analýzu. Existují různé typy reflexních technik (spekulární reflexe, difuzní reflexe (DRIFT), zeslabená úplná reflexe (ATR) a měření reflexně-absorpčních spekter), z nichž každá má své výhody a nevýhody [11].

2.1.1.1 Metoda zrcadlového odrazu (Spekulární reflexe)

Jde o moderní nedestruktivní metodu, jejíž podstatou je zrcadlový odraz na povrchu vzorku. U této techniky je splněna podmínka lineární optiky, kdy úhel dopadu infračerveného záření je roven úhlu jeho odrazu [16]. Spekulární reflexe je relativně slabý proces a u mnoha organických vzorků se odráží jen 5 až 10 % energie. Proto by vzorky nevodivých materiálů měly mít rovný a hladký lesklý povrch, protože jinak by byla většina energie dopadající na vzorek rozptýlena a ne odražena. A zároveň by měl mít co největší plochu pro analýzu, abychom získali spektra s vysokým poměrem signálu k šumu [13]. Proto se k získání spekter pozadí používají lesklé kovy, jako jsou stříbro, hliník nebo zlato.

Spekulárně reflexní spektra se odlišují od normálních transmisních spekter hlavně tím, že se vyznačují přítomností záporně orientovaných pásů. Změny v odrazivosti jsou výsledkem superpozice dvou optických parametrů, indexu lomu a extinkčního koeficientu. Tento jev lze eliminovat Kramers-Kronigovou transformací [17], která umožní vypočítat rozptyl a spektrum extinkčního koeficientu ze spekulárních dat a tak získat spektra podobná transmisním. Kramers-Kronigova transformace je popsána vztahem [11]:

$$n(\nu') = n_{\infty} + \frac{2}{\pi} \int_{-\infty}^{+\infty} \frac{k(\nu)\nu}{\nu^2 - \nu'^2} d\nu$$

kde n je index lomu při frekvenci ν' , n_{∞} je index lomu při frekvenci $\rightarrow 0$, ν' je frekvence, ν je frekvence při maximální absorpci a k je extinkční koeficient.

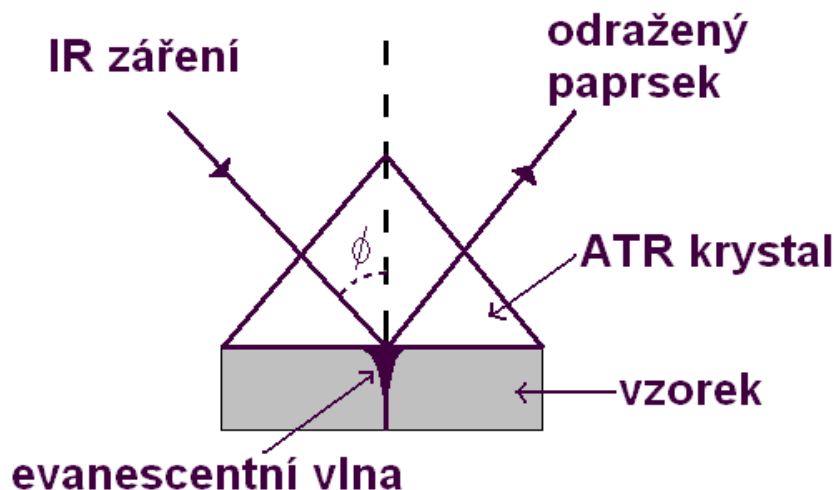
2.1.1.2 Metoda zeslabené totální reflexe (ATR)

Jde o obzvláště rozšířenou metodu infračervené mikroskopické analýzy, neboť nevyžaduje přípravu vzorku a poskytuje spektra srovnatelná s transmisními. K zeslabenému úplnému odrazu dochází, pokud je vzorek v kontaktu s odrazovým prvkem, který má vyšší index lomu než vzorek. Tento prvek se označuje jako ATR krystal ze selenidu zinečnatého (ZnSe) s indexem lomu 2,4 nebo germania (Ge) s indexem lomu 4,0 a dalších materiálů [18].

Pokud záření dopadá na krystal pod úhlem větším než je kritický úhel, paprsek se úplně vnitřně odrazí (Obr.1). Kritický úhel pro záření procházející z prostředí s vyšším indexem lomu do prostředí s nižším indexem lomu je definován vztahem [11]:

$$\phi_c = \arcsin \frac{n_1}{n_2}$$

kde ϕ_c je kritický úhel, n_1 je index lomu krystalu a n_2 je index lomu vzorku.



Obr. 1 Schéma totálního odrazu na rozhraní ATR krystalu a vzorku.

Na rozhraní krystalu a vzorku vzniká evanescentní vlna, která se šíří podél rozhraní a kolmo na rozhraní ubývá exponenciálně. Z toho vyplývá, že pokud je absorbující materiál v kontaktu s krystalem, evanescentní vlna bude absorbována při vlnových délkách, při kterých absorbuje materiál a o toto množství je energie odraženého záření nižší [18].

Vzdálenost, kterou se evanescentní vlna šíří z povrchu krystalu do vzorku, s jehož povrchem je v kontaktu, může být definována hloubkou průniku (penetrace). Výsledná hloubka penetrace záření do vzorku je definována vztahem [11]:

$$dp = \frac{\lambda}{2\pi n_1 (n_1^2 \sin^2 \phi - n_2^2)^{1/2}}$$

kde dp je hloubka průniku záření, λ je vlnová délka záření, ϕ je úhel dopadu záření na fázové rozhraní, n_1 je index lomu krystalu a n_2 je index lomu vzorku.

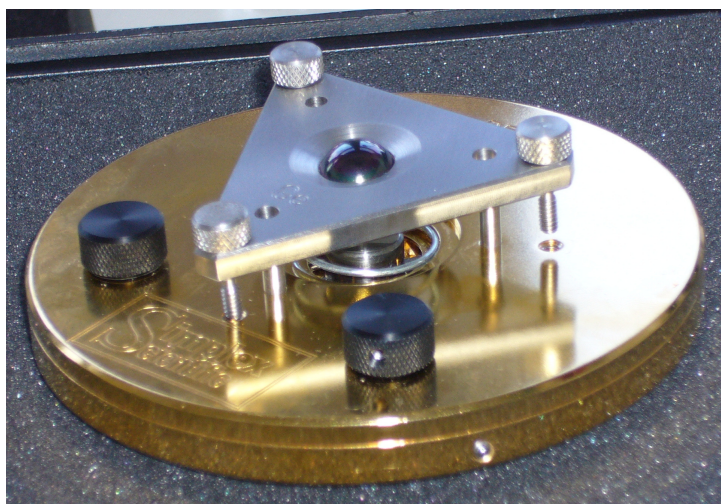
Získané spektrum vzorku je tedy ovlivněno vlnovou délkou infračerveného záření, poměrem indexů lomu měřeného vzorku a ATR krystalu, efektivní dráhou záření, úhlem dopadu záření na fázové rozhraní a kontaktem mezi měřeným vzorkem a ATR krystalem.

Z uvedeného je patrné, že penetrační hloubka infračerveného záření do vzorku závisí na vlnové délce záření [11]. S rostoucí vlnovou délkou záření se zvyšuje hloubka penetrace. Z toho pak plyne, že se relativní intenzity pásů ve spektru snižují s rostoucími hodnotami vlnočtů ve srovnání se spektry v transmisním modu. Tento jev je matematicky kompenzován ATR korekcí, která je standardní součástí softwarového vybavení spektrometrů s Fourierovou transformací.

Také poměr indexů lomu velmi ovlivňuje penetrační hloubku. Zvyšováním indexu lomu ATR krystalu se penetrační hloubka snižuje (např. výměnou krystalu ze ZnSe za krystal z Ge). Současně se sníží efektivní dráha paprsku a relativní intenzita pásů ve spektru. Vzhledem k tomu, že je hloubka penetrace záření do vzorku řádově v mikrometrech, je velmi důležité dodržovat těsný kontakt vzorku s krystalem [19, 20]. Při měření map touto technikou může být použit nástavec (krystal ve tvaru hrotu), se kterým se během měření pohybuje po vzorku.

2.1.1.3 Metoda „inverzní“ ATR

„Inverzní“ ATR se zakládá na stejném principu jako předchozí ATR technika, ale liší se způsobem provedení měření. V tomto případě nepohybujeme hrotem krystalu po vzorku, ale používáme speciální „inverzní“ ATR nástavec (Obr.2), kterým se větší ATR krystal připevní na vzorek. Při měření map se pak posouvá krystal zároveň se vzorkem a jejich vzájemný kontakt a poloha se během měření nemění.



Obr. 2 Nástavec společnosti Simplex Scientific LLC pro „inverzní“ ATR s krystalem z germania

2.1.2 Ramanova mikrospektroskopie

Jde o metodu založenou na nepružném rozptylu fotonů monochromatického záření vyzařovaného z laserového zdroje [21]. Ramanův rozptyl je způsoben interakcí fotonů spojenou se změnou polarizovatelnosti molekuly v průběhu vibrace. Ramanova spektroskopie byla v minulosti, kvůli problémům s degradací vzorku a fluorescencí, využívána méně než infračervená spektroskopie. V dnešní době se její použití rozšiřuje díky rozvoji laserové technologie, výrobě velmi účinných filtrů k potlačení elastického Rayleighova rozptylu, vývoji extrémně citlivých detektorů a díky novým metodickým přístupům ke zvýšení intenzity signálu [22].

Měření při použití laseru s vlnovou délkou ve viditelné oblasti často ztěžuje nebo znemožňuje fluorescence [23]. Záleží na vzorku nebo v něm obsažených nečistotách. Fluorescence může úplně překrýt Ramanova spektra. Může být potlačena nebo výrazně snížena výběrem excitační vlnové délky v blízké infračervené oblasti, modulací polarizace, úpravou spektra nebo filtrováním Fourierovou transformací [24].

Ramanovo spektrum se získává díky neelastickému rozptylu koherentního monochromatického záření z laseru, který může být zaostřen na malý bod. Má tak potenciál pro mikroskopické techniky. Ramanův mikroskop může být konstruován konfokálně a umožnit tak hloubkové profilování. Optické vlastnosti čoček objektivu a další optiky určují prostorové rozlišení, které je obzvlášť velké v konfokální

technice [25]. Zákon difrakce poskytuje teoretické omezení prostorového rozlišení (Δx), které je závislé na vlnové délce laseru (λ) a numerické apertuře (NA) objektivu ($\Delta x = 0,61\lambda/NA$) [21].

Klasické disperzní Ramanovy mikrospektrometry se skládají z laserů o excitační vlnové délce ve viditelné oblasti (např. Ar⁺, He-Ne, Nd:YAG lasery), disperzního spektrometru a CCD (Charge-coupled device) detektoru. Tento systém spojený s konfokálním mikroskopem vybaveným objektivy s vysokou numerickou aperturou, umožňuje získat vysoké prostorové rozlišení [25].

Zavedení dvojrozměrných detektorů v kombinaci s přesnými motorizovanými *x-y-z* stolky poskytuje, vedle získávání jednotlivých spekter, účinnou metodu označovanou jako Ramanovo zobrazování a mapování [26]. Je využívána pro analýzu živých objektů, jako jsou např. buňky ve fyziologickém prostředí [27, 28]. Pro farmacii je vhodnou technikou při vývoji formulací, lze s ní pozorovat distribuce směsi látek v matrici během rozpouštění a pochopit a zohlednit všechny okolnosti, které uvolňování látek ovlivňují [9].

2.2 Chemometrické postupy pro hodnocení spektrálních map

Metody, pomocí kterých vytváříme distribuční mapy, a které tak napomáhají určit rozložení jednotlivých složek ve vzorku, se rozdělují do dvou hlavních skupin, první skupina zahrnuje jednorozměrnou analýzu a druhá skupina vícerozměrné analýzy [29].

Jednorozměrná analýza je nejjednodušší metoda získání distribučních map. Jednotlivé chemické složky ve vzorku absorbují nebo rozptylují záření při určitých vlnových délkách v závislosti na chemických vazbách, které je tvoří. Pokud vybereme ze spektra vzorku pás, jeho plochu nebo pološířku charakterizující určitou složku, zobrazíme její rozložení v distribuční mapě pomocí bodů s nejvyšší intenzitou [29].

Přestože je tato metoda jednoduchá a přímá pro určení distribuce složek ve vzorku, vyžaduje, abychom dobře znali složení studovaného materiálu a věděli, jak spektra jednotlivých složek vypadají [29]. V některých případech, jako je překrytí pásů

ve směsných spektrech, neznalost určité složky (např. studium kontaminací) nebo příliš nízká koncentrace látky ve vzorku, nedokáže jednorozměrná analýza dostatečně spolehlivě vytvořit distribuční mapu. V takových případech je vhodnější použít vícerozměrnou analýzu.

Vícerozměrná analýza počítá se všemi spektrálními informacemi ze souboru naměřených dat [29]. Existuje několik dostupných analytických způsobů, jak naměřená data využít k určení distribuce látek. Od metod faktorové analýzy, jejímž cílem je snížit rozměr roztříděním základních proměnných, po shlukové techniky, které vyhledávají skupiny spekter na základě společných rysů. Nejčastěji používanou analýzou s latentními proměnnými je analýza hlavních komponent (PCA) [30]. Cílem PCA je snížení rozměrnosti matice odstraněním korelací mezi proměnnými a převedením dat na nové hlavní komponenty. První hlavní komponenta má směr největší variability dat, druhá, a každá následující hlavní komponenta, je ortogonální (tzn. kolmá na všechny předcházející) a popisuje maximální množství zbývajících variability dat. Po PCA transformaci může analýza zavést negativní hodnoty do výsledné matice a tak může být těžké určit vztah výsledků k chemickým složkám [31]. Z toho důvodu byla vytvořena alternativní metoda, která objasňuje spektra čistých složek a jejich koncentrací ve směsném spektru. Tato metoda je založena na bilineárním modelu, podle kterého je absorbance vzorku součtem všech dílčích absorbancí chemických složek vzorku. Tedy směsné spektrum může být viděno jako vážený součet každého spektra čisté látky a šumu měření. Bilineární model se matematicky popisuje jako [32]:

$$X=CS^T + E$$

kde X je obousměrný signál matice, C je matice koncentrací složek v každém bodě, S^T je matice obsahující spektra čistých složek a E je chyba měření způsobená změnou signálu, která ale nepochází od složek vzorku.

Nové komponenty, tedy výsledky PCA, jsou buď porovnány se spektry čistých látek a podle podobnosti spekter jsou komponentám přiřazeny jednotlivé složky, nebo jsou výsledky použity jako vstupní data pro následnou shlukovou analýzu [30, 31]. Výsledkem obou postupů je distribuční mapa vzorku.

2.3 Složení a výroba tablet

2.3.1 Hypolipidemika

Hlavní a nejdůležitější složkou jakékoliv tablety je účinná látka. V případě této práce byly studovány tablety obsahující látky ze skupiny hypolipidemik a proto jsou v následujícím textu krátce představeny.

Jako hypolipidemika jsou označovány látky snižující krevní lipidy. Zvýšení plazmatických koncentrací celkového cholesterolu nebo triglyceridů (hyperlipoproteinemie) představuje riziko významných metabolických poruch [33]. Typ průvodních onemocnění i výběr farmak záleží na tom, který z různých lipoproteinů se u pacienta vyskytuje ve zvýšené koncentraci [34]. Podle druhu lipoproteinu se hypolipidemika dělí do tří skupin: na látky ovlivňující preferenčně plazmatickou hladinu cholesterolu (statiny, pryskyřice), na látky preferenčně ovlivňující plazmatickou hladinu triglyceridů (fibráty, kyselina nikotinová) a ostatní hypolipidemika (tyroxin, nenasycené mastné kyseliny, esenciální fosfolipidy aj.) [33].

Lipoproteiny v krvi představují transportní formu ve vodě nerozpustných lipidů [34]. Jednotlivé lipoproteiny se liší obsahem triglyceridů, cholesterolu, fosfolipidů a apolipoproteinů. Podle své hustoty se dělí na chylomikra, VLDL (lipoprotein s velmi nízkou denzitou), LDL (lipoprotein s nízkou denzitou) a HDL (lipoprotein s vysokou denzitou). Vyšší koncentrace cholesterolu v krvi obvykle znamená vzestup hladiny LDL, vyšší koncentraci triglyceridů a vzestup hladiny VLDL. Patologické zvýšení hladiny LDL, tedy hypercholesterolemie, patří mezi základní faktory přispívající ke vzniku aterosklerózy [33]. Riziko aterosklerózy se zvyšuje i při nižší koncentraci HDL, kterou snižují rizikové faktory jako např. nadváha, kouření nebo špatně kompenzovaný diabetes mellitus [34]. Hyperlipidemie jsou buď primární, geneticky podmíněné, nebo častěji se vyskytující sekundární, které bývají spojeny s jinou chorobou (diabetes, hypothyreóza aj.).

Farmakoterapie je opodstatněná pouze při dieteticky nezvládnutelných hyperlipidemiích. Statiny jsou dnes nejúčinnější hypocholesterolemika. Po jejich dlouhodobém podávání bylo prokázáno snížení koronárních příhod i mortality léčených pacientů. Kromě dobré účinnosti je jejich výhodou výskyt relativně malých nežádoucích

účinků. Tyto látky se používají v závislosti na rizikovém profilu pacienta a podávají se v případech, jestliže hladina LDL cholesterolu dosáhla hraniční hodnoty 130-180 mg/100 ml (3,4-4,6 mmol/l), po prodělaném infarktu myokardu i při nízkých hodnotách HDL. Statiny jsou kompetitivní inhibitory klíčového enzymu nitrobuněčné syntézy cholesterolu. Blokují převedení aktivované kyseliny 3-hydroxy-3-methylglutarové na kyselinu mevalonovou inhibicí enzymu HMG-CoA reductázy (3-hydroxy-3-methylglutaryl-koenzym A reductáza). Protože syntéza cholesterolu není zablokována úplně, není porušena tvorba steroidních hormonů a tvorba žlučových kyselin. Výsledným efektem podání statinů je tedy snížení plazmatické hladiny cholesterolu, změna spektra lipoproteinů a sekundárně i pokles triglyceridů ve frakci LDL a VLDL [33, 34].

Dnes se nejčastěji používá 6 látek: lovastatin, simvastatin, pravastatin, fluvastatin, atorvastatin a cerivastatin. První inhibitory uvedené na trh lovastatin a simvastatin jsou předstupně, ze kterých se po perorálním podání v játrech vytvoří vlastní účinná látka otevřením laktonového kruhu. Pravastatin se podává v aktivní formě jako hydroxykyselina. Dosud jmenované látky jsou mikrobiálního původu, fluvastatin je zcela syntetickou látkou a jeho struktura se od předchozích liší. Podává se v aktivní formě. Totéž platí o atorvastatinu a cerivastatinu. Obsahují stejně jako pravastatin otevřený laktonový kruh [33].

Po perorálním podání se v dostatečné míře resorbují [34]. Lovastatin a simvastatin přestupují z krve vena portae do jater, tam se přemění na účinnou formu a později vyloučí žlučí. Jde o presystémovou eliminaci, protože tímto způsobem se inhibice syntézy cholesterolu týká jater a endokrinní orgány vytvářející steroidní hormony jsou ušetřeny. Po podání fluvastatinu a pravastatinu se účinná látka nahromadí v hepatocytech působením aktivního transportního mechanismu, který se v jiných buňkách nevyskytuje. Lovastatin a pravastatin jsou absorbovány po perorálním podání asi z 30-50 %, zatímco fluvastatin a cerivastatin se vstřebávají téměř kompletně [33]. Naproti tomu se atorvastatin vstřebává jen z 7 %. Pravastatin je hydrofilní a prochází mozkomíšní bariérou do CNS méně než lipofilnější simvastatin. Poločas eliminace je krátký (1-16 hodin). Všechny statiny se silně vážou na plazmatické

bílkoviny. Rozkládají se v játrech, vylučují se do žluči a močí se vylučuje asi 20-40 % metabolizované látky.

Statiny jsou málo toxické a dobře snášené látky. Mohou se ovšem vyskytovat nežádoucí účinky jako trávicí poruchy, kožní reakce, poruchy jaterních funkcí nebo poruchy kosterního svalstva. Statiny nelze kombinovat s jinými hypolipidemiky (fibráty, deriváty kyseliny nikotinové) a s cyklosporinem A [33, 34]. Cerivastatin byl pro závažné nežádoucí účinky v létě 2001 stažen z trhu. Tyto látky by neměli dostávat těhotné a kojící ženy, protože může dojít k poškození plodu nebo kojence [35].

Rovnovážný stav účinku se dostaví s latencí několika týdnů, dávkování je nutno individuálně přizpůsobit účinku [34, 35]. Statiny jsou účinnější než pryskyřice nebo fibráty, jsou schopny snížit cholesterol až o 20-40 %. Při srovnání účinnosti jednotlivých látek na základě váhových jednotek je většina látek stejně účinná (20-80 mg), pouze atorvastatin se podává v nižších dávkách [33].

2.3.2 Pomocné látky

Samotné léčivé látky, případně jejich směsi, se používají v terapii jen ve výjimečných případech [36]. Prakticky vždy je lék více či méně složitým systémem léčivých a pomocných látek. Pomocné látky umožňují formování lékové formy, určují její vlastnosti, ovlivňují biologickou dostupnost léčiva, mají vliv na stabilitu léku a na smyslové vjemy při jeho podání [37]. Složení a forma musí respektovat místo a způsob jeho aplikace. Rovněž musí vlastní aplikaci v závislosti na předepsaném způsobu umožňovat a pokud možno maximálně zjednodušovat. Pomocné látky (vehikula, excipienty, auxilianty) se definují jako chemicky jednotné či nejednotné suroviny, popřípadě jejich směsi potřebné k výrobě nebo přípravě léků, které jsou buď jejich součástí, nebo které se uplatní v technologickém procesu, ale nejsou v hotovém přípravku obsaženy. Pomocné látky, které se stávají součástí léku, mají umožňovat nebo usnadňovat svými chemickými, fyzikálními a mechanickými vlastnostmi zpracování léčivých látek na lék s charakteristickou lékovou formou [36].

Základy granulátů a tablet tvoří plniva, pojiva, kluzné látky, látky podporující rozpad a rozpouštění, filmtvorné látky. Perorální kusové léky se vyrábějí tak, aby byly co možná nejmenší, protože tak se snadněji polykají. Manipulace s nimi na druhé straně vyžaduje, aby měly určitý objem a hmotnost. Za nejnižší vhodnou hranici se považuje 100 mg. Mnohé látky mají nižší dávkování, a proto se jejich jednotkové množství na uvedenou hranici zvyšuje přidáním indifferenční látky, plniva [36].

Často používaným plnivem je laktosa [36]. Je dobře rozpustná ve vodě, ve styku s mnoha léčivy je velmi stálá. Tablety s obsahem mléčného cukru se dobře rozpadají a léčivo se rychle uvolňuje. Mikrokrystalická celulóza (MCC) je nejlepší pomocnou látkou pro přímé lisování tablet, protože má největší schopnost zhušťování a vytváření pevných výlisků. MCC se získává z dřevní celulózy hydrolyzou, mikrokrystalický produkt se upravuje mechanickým rozměňováním a potom se suší. Změny podmínek hydrolyzy, rozměňování a sušení umožňují vznik více typů MCC s rozdíly ve velikosti částic, obsahu vody, zdánlivé hustotě a tokových vlastnostech. Dalšími plnivy jsou např. sacharóza, fosforečnan vápenatý nebo uhličitan vápenatý.

Pojiva se přidávají do granulátů a tablet ke zvýšení pojivých vlastností jejich součástí. Primárním kritériem je kompatibilita pojiva s ostatními součástmi tabletoviny. Práškové směsi musí dodávat dostatečné kohezivní vlastnosti, nesmí ale bránit rozpadu tablet, rozpouštění léčivé látky a jejímu uvolňování k absorpci. Přidávají se do tabletoviny buď jako roztok až gel, nebo jako látky tuhé, které se aktivují rozpouštědlem použitým při granulaci. Nejdůležitějšími pojivy jsou škrob (škrobový hydrogel, škrobová pasta), želatina a celulózové deriváty [38].

Látky podporující rozpad tablety, rozvolňovadla, usnadňují rozpad výlisků po aplikaci. Rozpad tablety vytváří předpoklad pro rozpouštění, uvolňování a absorpci léčiva. Rozvolňovadla se přidávají k tabletovině buď před granulací, pak jsou přítomny intragranulárně, nebo až k suchému granulátu, a pak jsou přítomny extragranulárně. Extragranulárně přidaná rozvolňovadla působí rychleji. K urychlení rozpadu se do tablet přidávají především škroby a mikrokrystalická celulóza [39]. Mají schopnost ve výlisku vytvořit kapilární kanálky, kterými proniká voda omezující fyzikální vazebné síly. Přírodní polymery galaktomanany, jako bobtnající látky, podporují rozpad tablety mechanicky [40].

Stearan hořečnatý, mastek nebo vosky se používají jako kluzné a antiadhezivní látky. Ty zlepšují tokové vlastnosti tabletoviny, ulehčují plnění matrice, zmenšují tření mezi tabletou a stěnou matrice při vysouvání tablety a zabraňují lepení na stěny matrice a plochy razidel. Mazadla většinou působí prodloužení doby rozpadu a zpomalení rozpouštění. To lze ovlivnit i použitím filmotvorných látek, např. polymethakrylátů, derivátů celulózy nebo želatiny, které tvoří stěnu potahovaných tablet [36].

2.3.3 Pevné lékové formy

Hlavním důvodem přetváření léčivých látek na léky je umožnění jejich podání. Podle místa aplikace a účelu léku je rozdělujeme na gastrointestinální, parenterální a topické. Gastrointestinální aplikace je nejpřirozenější cestou přívodu léčiv do organismu. Nevyžaduje odborný personál a léky lze technologicky upravit tak, že jejich užití není pro pacienta nepříjemné. Tuhé orální a perorální léky jsou hrubé disperzní systémy tuhé fáze ve fázi plynné (vzduch). V omezeném množství v nich může být přítomna i fáze kapalná. Do této skupiny léků patří tobolky (většinou želatinové) a různé druhy tablet [36].

Složení a způsob přípravy léku má velký vliv na terapeutický účinek léčiva [18]. Různé postupy při výrobě tablet ovlivňují liberaci (uvolňování) léčiva z léku k řízení nástupu účinku a délky jeho trvání (léky s rychlou liberací, s prodlouženým uvolňováním a léky s pulsním uvolňováním léčivé látky). Liberace je krokem, který řídí celý farmakokinetický proces nebo alespoň jeho rozhodující část. Na liberaci navazuje absorpce, tedy přestup rozpuštěné léčivé látky membránou do krevního oběhu. Při absorpci se většinou odděluje osud léčivé látky od osudu pomocných látek, které ji doprovázejí.

Výchozí surovinou pro výrobu tablet jsou prášky, tedy disperzní systémy složené z tuhé a plynné fáze. Částice tvořící tento systém, krystaly, úlomky krystalů nebo aglomeráty menších částic, se vzájemně dotýkají a to se promítá do jejich fyzikálních vlastností. Vlastnosti, které je při formulování, výrobě a předpovědi stability třeba znát jsou velikost a tvar částic, polymorfie krystalů, teplota tání, hustota, specifický povrch, pórovitost, obsah vody, tokové vlastnosti (sypkost) a mísitelnost

[41]. Prášky se dříve používaly jako samostatná léková forma, ale v dnešní době mají jen malé zastoupení [36].

Další z tuhých lékových forem jsou granulované prášky (granuláty). Granuláty jsou soubory hrubších, tuhých, suchých agregátů práškových částic dostatečně odolných proti mechanickému namáhání [36]. Hlavní význam mají jako poloprodukty pro výrobu tablet. Pro granulování směsí určených na lisování tablet jsou dva důvody: zlepšení tokových vlastností, které nastává zhuštěním primárních částic, a fixace léčivé látky na pomocné látky, která je předpokladem stejnoměrnosti směsi a tím přispívá ke stejnoměrnosti obsahu (dávky) léčiva v každé jednotlivé tabletě.

Granulační metody se rozdělují na granulaci suchou a vlhkou [36]. Suchá granulace je postup, při kterém se vytvoří přechodně větší shluky a ty se potom rozdrobní na granulátová zrna. Suchá granulace je zrnění bez použití rozpouštědla a tepla na sušení a proto je vhodná pro látky citlivé na vlhkost. Na druhé straně je potřeba použít vyšších lisovacích tlaků a vynaložit více energie, a tak je málo vhodná pro léčiva, která se inaktivují teplem. Výlisky se dobře rozpadají a rozpouštějí, lehce přijímají vodu, protože částice nespojují pojiva. Předpokladem suché granulace je dostatečná kohezivnost (plastická deformovatelnost) práškové směsi. Granulace za sucha, i když je provozně jednoduchá a výhodná, nepřináší tak dobré výsledky jako vlhká granulace, a proto se uplatňuje při výrobě u látek, které jsou nestálé a vlhkou granulaci nesnášejí (např. kyselina acetylsalicylová).

Použití vlhké granulace je v porovnání se suchou širší a univerzálnější. Přidáním kapalně fáze do tuhé práškové směsi se podstatně zlepšuje její deformovatelnost a usnadní její aglomerace [36]. Kapalnou fází mohou být rozpouštědla (voda a líh různé koncentrace) nebo roztoky polymerů, popř. tzv. vlhčiva, jako je škrobový hydrogel nebo roztok želatiny. Za vlhka se dosáhne velmi pravidelného rozdělení všech částí tabletoviny, zejména léčivých látek používaných v malých dávkách. Při vlhké granulaci bylo vyvinuto několik alternativních postupů a metod, v současnosti převládá granulace hnětením a ve fluidní vrstvě. Granulace probíhá v několika fázích: v první fázi se mísí suchý materiál a přidává vlhčivo (pojivo), částice se však neshlukují, v druhé fázi vznikají kapalinové můstky a částice se shlukují, na konci další fáze je třeba postřik vlhčiva zastavit, aby nedocházelo k nežádoucímu slepování částic nebo až vzniku

suspenze [42]. Řízení procesu granulace a její ukončení v pravý okamžik, který zaručuje standardní vlastnosti jednotlivých šarží granulátů, je automatizováno. Konec granulace lze určit sledováním spotřeby elektrické energie mixéru, kdy změny spotřeby závisí na množství přidávaného pojiva a na změnách hybnosti granulátových zrn v průběhu formování [43]. Při sušení granulátu vznikají slepením zrn sekundární aglomeráty, které je třeba zhomogenizovat rozdrobněním a prosít. K suchému granulátu se ještě přidávají látky, které mají být ve výlisku extragranulárně, jako např. kluzné látky nebo látky podporující rozpad tablet [36].

Z takto připravených tabletovin vyrábíme tablety [44]. Zpracováváme-li směs účinných a pomocných látek bez předcházející granulace, jde o přímé tabletování (přímé lisování). Rozhodující operací je formování tablet v tabletovacích lisech. Lze použít lisy výstředníkové nebo rotorové. Tablety připravené na odlišných typech tabletovacích lisů se liší fyzikálními vlastnostmi, vnitřní strukturou, povrchovou tvrdostí a pórovitostí. Pro výrobu velkých šarží jsou vhodnější lisy rotorové, protože tablety v nich slisované mají vyšší jakost. Výstředníkové lisy jsou vhodné pro menší provozy, pro výrobu malých šarží i pro vývojové práce.

Pokud chceme upravit místo rozpadu tablety nebo rychlost rozpouštění, jedním ze způsobů je výlisky obalit pomocnými nebo filmotvornými látkami. Další možností je výroba tablet s řízeným uvolňováním [38]. K výrobě takových tablet se používají speciální pomocné látky nebo postupy měnící rychlost uvolňování a absorpci léčivých látek v gastrointestinálním traktu. Používají se dva základní typy těchto přípravků, a to zásobníkový a matricový. Zásobníkový typ má jádro a obal (membránu). Jádro tvoří léčivo v tuhém nebo kapalném skupenství, obal je polymer, který má řídicí funkci, ovládá uvolňování léčivé látky do biofáze. Uvolňování léčivé látky probíhá na základě rozpouštění, difuze nebo osmózy. Matricový typ tablety s řízeným uvolňováním nemá membránu, léčivo je dispergované v určitém objemu polymeru. Polymer se v biologickém prostředí buď nerozpouští, léčivá látka se z něho uvolňuje rozpouštěním a difuzí, nebo se v biologickém prostředí postupně rozkládá a rozpouští a léčivo se z něho uvolňuje rozpouštěním [36].

2.3.4 Polymorfismus

Některé chemicky čisté látky mají schopnost vytvořit vlivem vnějších faktorů, teploty, tlaku a podmínek krystalizace tuhé systémy s různým vnitřním uspořádáním. Této vlastnosti se u prvků říká alotropie a u sloučenin polymorfie. Změnami teploty a tlaku mohou polymorfní modifikace navzájem přecházet jedna ve druhou [36, 45]. Polymorfismus se nejčastěji vyskytuje u organických sloučenin. Bylo dokázáno, že asi 80 % léčivých látek je polymorfních. Jednotlivé polymorfní formy látek jsou chemicky identické, ale výrazně se liší svými fyzikálními vlastnostmi. Značné rozdíly jsou v rozpustnosti jednotlivých forem, bodech tání, hustotách, rentgenové difrakci a ve vzhledu spekter molekul [45, 46]. Zvláště je kladen důraz na rozpustnost léčivých látek ve vodě. Je pravděpodobné, že právě rozpustnost látky ve vodě ovlivňuje biologickou dostupnost léčiv. Proto je důležité, abychom si při výrobě farmaceuticky aktivních látek, byli jisti, že vždy získáme stejnou formu této látky [47, 48].

Polymorfismus se netýká jen farmaceuticky aktivních látek, ale také látek pomocných. I ty se vyskytují v různých formách a liší se nejen v rozpustnosti a rychlosti rozpouštění, ale i v hustotě, zhušťovatelnosti, tokových vlastnostech a stálosti v tuhém stavu. Proto je důležité znát krystalovou stavbu každé látky a na výrobu léku použít tu modifikaci, která je nejvýhodnější z hlediska stálosti, biologické dostupnosti nebo technologického procesu. Krystalové modifikace mohou vznikat i při rozdrobňování granulátů, sušení a lisování. Přechody polymorfních forem může způsobit i rozpouštědlo použité při granulaci a vyvolat tak technologické problémy (lepivá, těžko granulovatelná hmota) [36].

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Použitý materiál

Veškerý materiál použitý v této práci byl poskytnut společností Zentiva. Z důvodu zachování obchodního tajemství nebude v práci jmenována účinná látka obsažená ve vzorcích, ale bude nazývána a dále označována jako API, tedy aktivní farmaceutická složka. Jednotlivé látky (excipienty i API) byly vzorkovány ze skladových zásob podniku a jejich čistoty ověřeny metodou vysoko účinné kapalinové chromatografie ve společnosti Zentiva. Čistota látek je více než 99 %.

kyselina acetylsalicylová (ASA č. š. 8046092)

bromid draselný

standard polystyrenu (serial FADP 4866, issued 03/31/04)

vápenatá sůl API

uhličitan vápenatý

Avicel 200 – mikrokrytalická celulóza

Laktosa SD

Klucel EF (B. N. 9090992) - hydroxypropylcelulóza

Ac-di-sol – sodná sůl kroskarmelózy

vzorek A – tableta generického léku

vzorek B – tableta originálního léku

3.2 Infračervená mikrospektroskopie

3.2.1 Instrumentace

Všechny vzorky byly měřeny přístrojem Nicolet iN10 MX, infračerveným zobrazovacím mikroskopem společnosti Thermo Scientific. Příklad byl vybaven

objektivem 15 x 0,7 N.A., barevnou digitální kamerou pro snímání video obrazu vzorku a x-y-z motorizovaným stolkem. Spektra byla detekována MCT detektorem chlazeným kapalným dusíkem. Celý systém byl řízen programem Omnic Picta (ver. 1.10). Spektra byla měřena v intervalu 600 – 4000 cm^{-1} s rozlišením 8 cm^{-1} .

Pro měření spekter a map ATR technikou byl použit nástavec s mikrohrotem ATR krystalu Ge a nastaven tlakový profil 3. Ke sběru map „inverzní“ ATR metodou byly do stolku mikroskopu instalovány nástavce společnosti Simplex Scientific LLC s krystaly Ge Hemisphere 12 mm optic nebo ZnSe Hemisphere 12 mm. Ty byly připevněny na vzorek pomocí tří šroubů (viz Obr. 2).

3.2.2 Hledání optimálních podmínek měření

Vliv úpravy vzorku na kvalitu spekter a výběr vhodné apertury

Spektra vzorků byla měřena reflexními metodami. K určení optimálních experimentálních podmínek byla díky snadné dostupnosti použita kyselina acetylsalicylová. Nejprve byl testován vliv přípravy vzorků na reflexní spektra. Kyselina acetylsalicylová (dále ASA) byla měřena volně sypaná, lisovaná ručním lisem a ve formě tablet, které byly vytvořeny hydraulickým lisem z nemleté ASA a z mleté ASA. Tyto vzorky byly změřeny pro různý počet měření (8 – 256 skenů) a jednotlivé velikosti apertury od 10 μm až po aperturu 150 μm .

Vliv bromidu draselného na kvalitu spekter

Mletá tableta ASA byla dále použita k posouzení vlivu různě namletého bromidu draselného na spekulární reflexi. Bromid draselný byl mlet v kulovém mlýnku po dobu 10 a 30 s. Vzorky byly připraveny poprášením tablety ASA bromidem draselným a přitlačením bromidu draselného na tabletu. Všechny vzorky byly měřeny pro aperturu 50 μm a 100 μm s počtem 64 skenů.

Vliv lisovacího tlaku

Vápenatá sůl API byla upravena do různých forem, podobně jako kyselina acetylsalicylová, tedy volně sypaná, lisovaná ručním lisem a ve formě tablety lisované

hydraulickým lisem. Při apertuře 50 μm a 16 skenů bylo technikami spekulární reflexe a ATR studováno, zda tlak použitý na přípravu vzorků nevyvolá případné polymorfni přechody.

Vliv místa měření na „inverzní“ ATR krystalu

Při použití nástavce pro „inverzní“ ATR bylo nejprve nutné zjistit, jak se mění kvalita spekter v závislosti na vzdálenosti měřeného bodu od středu krystalu. Byl použit standard polystyrenu a měřeny liniové mapy přes celý průměr krystalu. Apertura byla zvolena 100 μm a jednotlivé body mapy byly od sebe vzdáleny také 100 μm .

3.2.3 Mapování řezu tablet

Před vlastním mapováním byla nejprve naměřena spektra jednotlivých složek, které vzorky tablet A a B obsahovaly. Z těchto informací byly vytvořeny knihovny spekter pro reflexní a ATR techniku. Vzorky tablet byly k měření map seříznuty skalpelem do roviny. Apertura byla s ohledem na velikost částic API, která se při vstupní kontrole surovin pro výrobu pohybovala okolo 30 μm , zvolena 30 μm a vzdálenost (krok), po které se body v mapě posouvaly 30 μm . Každé spektrum v mapě bylo měřeno 64-128 skeny. Pro zpracování map byla použita jednorozměrná analýza a analýza hlavních komponent pomocí programu Wizard softwaru Omnic. Komponenty byly vytvořeny podle oblasti valenčních vibrací (3400 – 2800 cm^{-1}) a oblasti fingerprint s vibrací karbonylu (1800 – 800 cm^{-1}). Tím byla také zajištěna eliminace příspěvku vzdušného oxidu uhličitého a vodní páry, jejichž koncentrace v průběhu několikahodinového měření kolísala. Vytvořeným komponentám byly podle knihoven přiřazeny jednotlivé složky a bylo určeno rozložení látek ve vzorku. Pro srovnání jednotlivých technik byly mapy tablet A a B měřeny metodami spekulární reflexe, ATR a „inverzní“ ATR.

3.3 Ramanova mikrospektroskopie

3.3.1 Instrumentace

Vzorky byly měřeny disperzním Ramanovým mikroskopem Nicolet DXR společnosti Thermo Scientific. Přístroj byl vybaven objektivy 10 x 0,25 N.A., 50 x 0,75 N.A., kamerou pro snímání video obrazu vzorku, excitačními lasery (532 nm, 633 nm, 780 nm) a x-y-z motorizovaným stolkem. Spektra byla detekována CCD detektorem. Celý systém byl řízen programem Omnic s integrovaným programem Omnic Atlas umožňující mapování vzorků a analýzu naměřených map.

3.3.2 Hledání optimálních podmínek měření

Výběr laseru

Všechny excipienty a účinná látka byly měřeny třemi dostupnými lasery o vlnových délkách 532 nm, 633 nm a 780 nm. Ze získaných spekter byl vybrán pro náš účel nejvhodnější laser 532 nm. Při všech měřeních byl použit objektiv 10x/0,25 NA, doba měření jednotlivých spekter 32 s, apertura 50 μm tvaru štěrbin (obdélník) a rozlišení 4 cm^{-1} .

Výběr objektivu

Pro měření jednotlivých složek byl použit objektiv s 10násobným zvětšením a numerickou aperturou 0,25. Při mapování tablet byl použit objektiv s 50násobným zvětšením a numerickou aperturou 0,75.

Odstranění fluorescence

Všechny látky, kromě uhličitanu vápenatého, vykazovaly fluorescenční záření překrývající Ramanův signál. Fluorescence byla odstraněna korekcí fluorescence 6. řádu, která je součástí programu Omnic.

3.3.3 Mapování řezu tablet

K mapování byly použity stejné vzorky tablet (vzorek A a B) jako pro infračervené mapování. Pro získání rovnější a pravidelnější plochy vzorku byly tablety zality do parafínu a seříznuty na mikrotomu. K měření byl použit laser 532 nm s výkonem 10 mW, apertura 25 μm (ve tvaru otvoru), objektiv 50x/0,75 NA a mřížka 900 l/mm. Doba měření jednotlivých spekter mapy byla 32 s, velikost kroku 25 μm a pro odstranění fluorescence byla použita korekce 6. řádu v programu Omnic.

4 VÝSLEDKY A DISKUZE

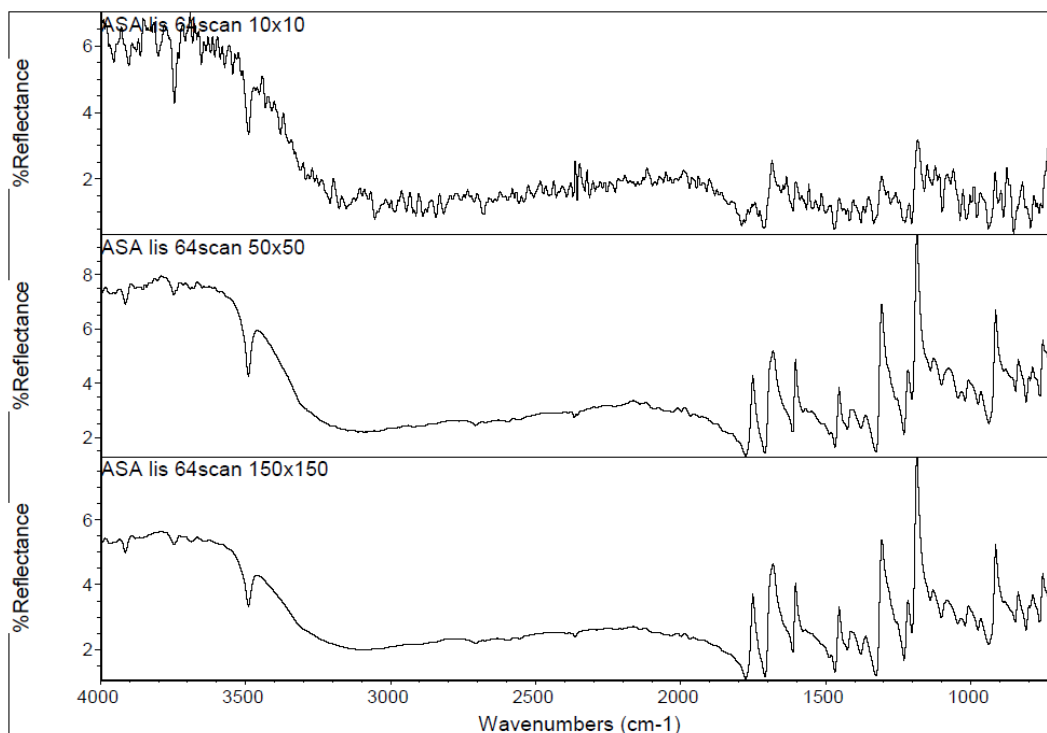
Vliv úpravy vzorku na kvalitu spekter a výběr vhodné apertury

Ke zjištění vlivu úpravy vzorku na kvalitu spekter byla kyselina acetylsalicylová (ASA) měřena v různých formách (volná, lisovaná, mletá a nemletá v tabletě) technikou spekulární reflexe. Ve spektrech lisované ASA (viz. 2. spektrum Obr. 3) a tablety z nemleté ASA je rozlišení lepší, pásy v oblasti valenčních vibrací jsou v těchto případech intenzivnější než například u tablety z mleté ASA (viz. 1. spektrum Obr. 4). Je zřejmé, že úprava povrchu je důležitá, pokud je povrch příliš hladký a lesklý, ve spektru převažují pásy reflexní distorze. Spektra jsou směsí spekulární a difúzní reflexe, proto je nelze upravit pomocí Kramers Kronigova algoritmu.

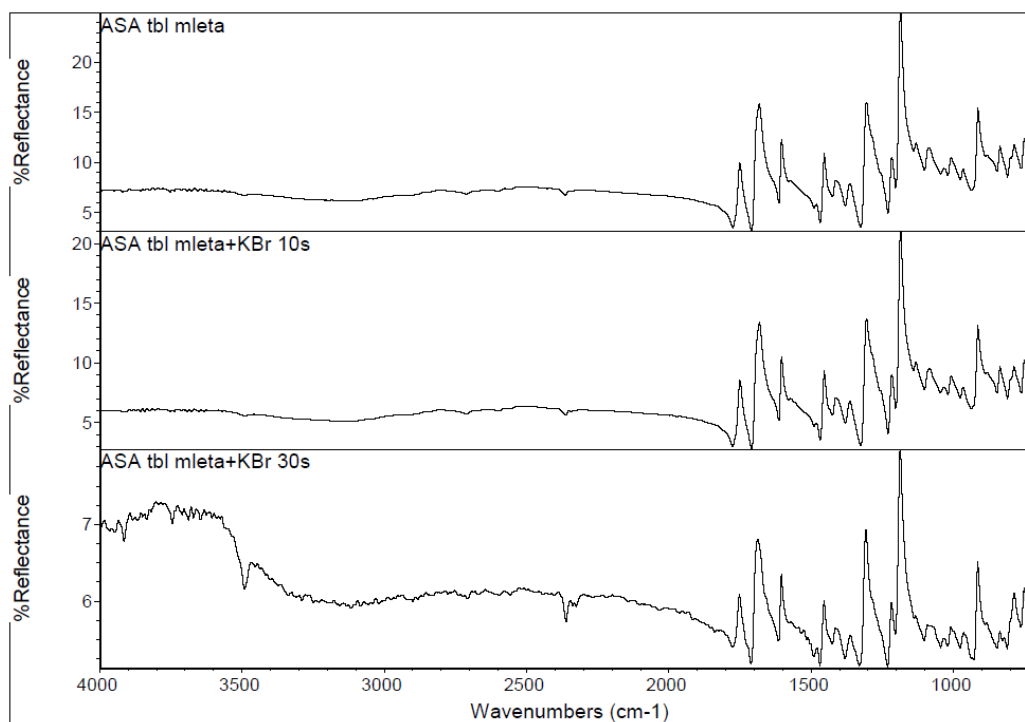
Dalším sledovaným aspektem byl výběr vhodné apertury a počtu měření. Proto byla kyselina acetylsalicylová měřena pro všechny apertury (od 10 μm do 150 μm) a počty měření (8-256 skenů). Při malé apertuře 10 μm , 20 μm jsou spektra více zašuměna i při vyšším počtu měření (Obr. 3). Naopak při větších aperturách od 100 μm jsou spektra bez šumu. Mezi takto vysokými aperturami pak ve spektrech nevidíme rozdíly. Platí tedy, že čím je apertura větší, tím menší je šum, ale snímaná plocha je větší. Při měření čistých látek toto není problém, ale pokud měříme heterogenní směs látek, je třeba počítat i s velikostí částic. Měřením získáváme průměrná spektra, tedy spektrální směs více látek, ale použitím apertury stejné nebo menší než je velikost částic ve směsi lze získat přesnější informace. Jako nejvhodnější apertura byla zvolena apertura 30 až 60 μm a jako optimální počet měření 64 skenů, tedy 25 s.

Vliv bromidu draselného na kvalitu spekter

Ke zlepšení kvality spekter, tedy odstranění reflexní distorze, bylo ještě studováno využití různě namletého bromidu draselného. Po aplikaci bromidu draselného na tabletu z mleté kyseliny acetylsalicylové a po porovnání se spektry kyseliny acetylsalicylové bez bromidu draselného, nebyl zjištěn významnější vliv na kvalitu spekter (Obr. 4).



Obr. 3 Spektra kyseliny acetylsalicylové měřená spekulární reflexí s aperturou 10, 50 a 150 μm .



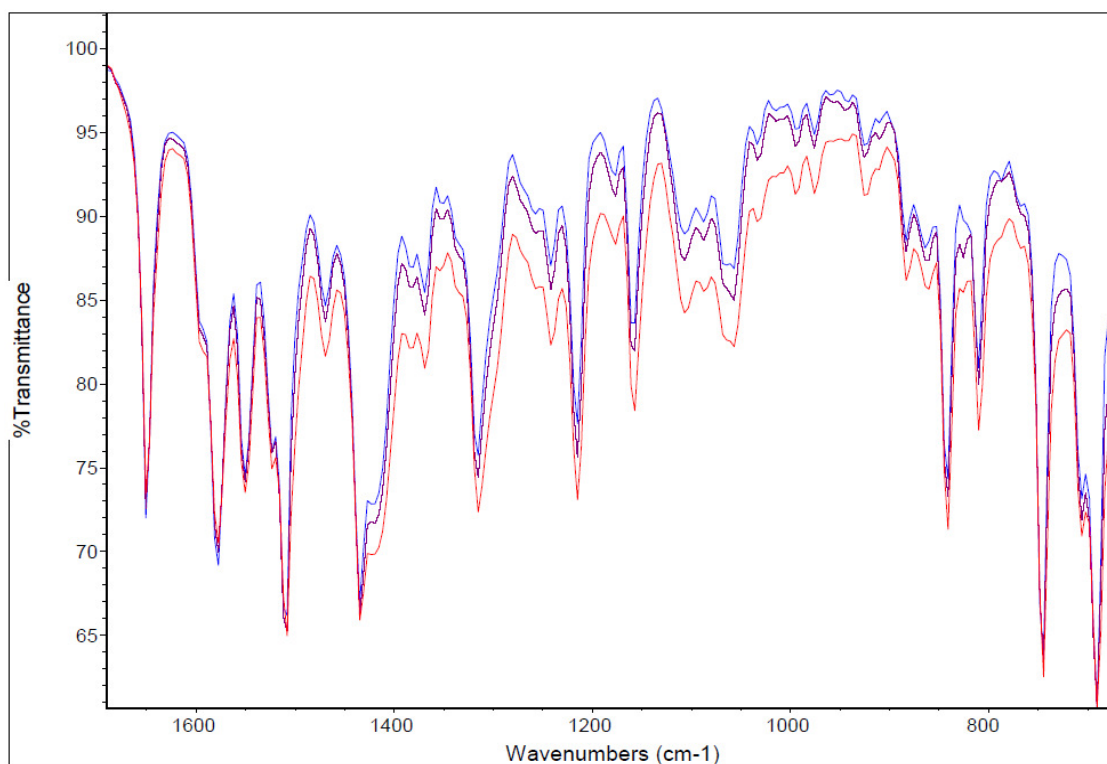
Obr. 4 Vliv bromidu draselného na kvalitu spekter kyseliny acetylsalicylové. Zobrazení reflexního spektra tablety z mleté ASA, reflexního spektra ASA s přitlačeným bromidem draselným 10 s mletým v kulovém mlýnku a reflexního spektra ASA s přitlačeným bromidem draselným mletým 30 s v kulovém mlýnku.

Vliv lisovacího tlaku

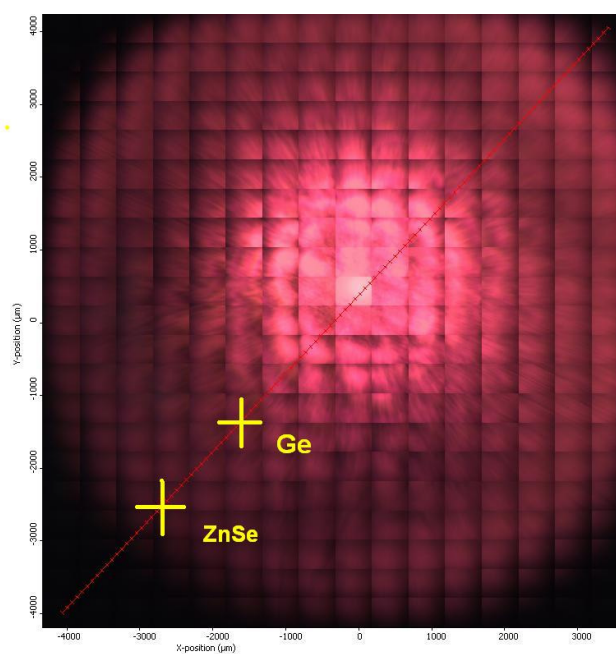
Látky používané jako farmaceuticky aktivní se často vyskytují v různých polymorfních formách. Látka ze skupiny statinů, obsažená v měřených vzorcích tablet, se také vyskytuje v několika polymorfních formách a ty v sebe často přecházejí. Jednotlivé polymorfní formy látek se liší polohou pásů ve spektrech. Úpravou vápenaté soli API různými způsoby vzorkování (sypaná, lisovaná a stlačená do tablety) a porovnáním jejich reflexních a ATR spekter bylo ověřeno, že tlak použitý k přípravě vzorků v tomto případě nezpůsobuje polymorfní přechody. To je zřejmé z obrázku (Obr. 5), kde jsou zobrazeny oblasti vibrací karbonylu a oblasti „otisku prstu“ ATR spekter vápenaté soli API zpracované různým tlakem do vzorků. Pásky v jednotlivých spektrech nejsou vůči sobě posunuty, kromě drobných změn základní linie, nedošlo použitím tlaku při přípravě vzorku ke vzniku jiných forem aktivní látky.

Vliv místa měření na „inverzním“ ATR krystalu

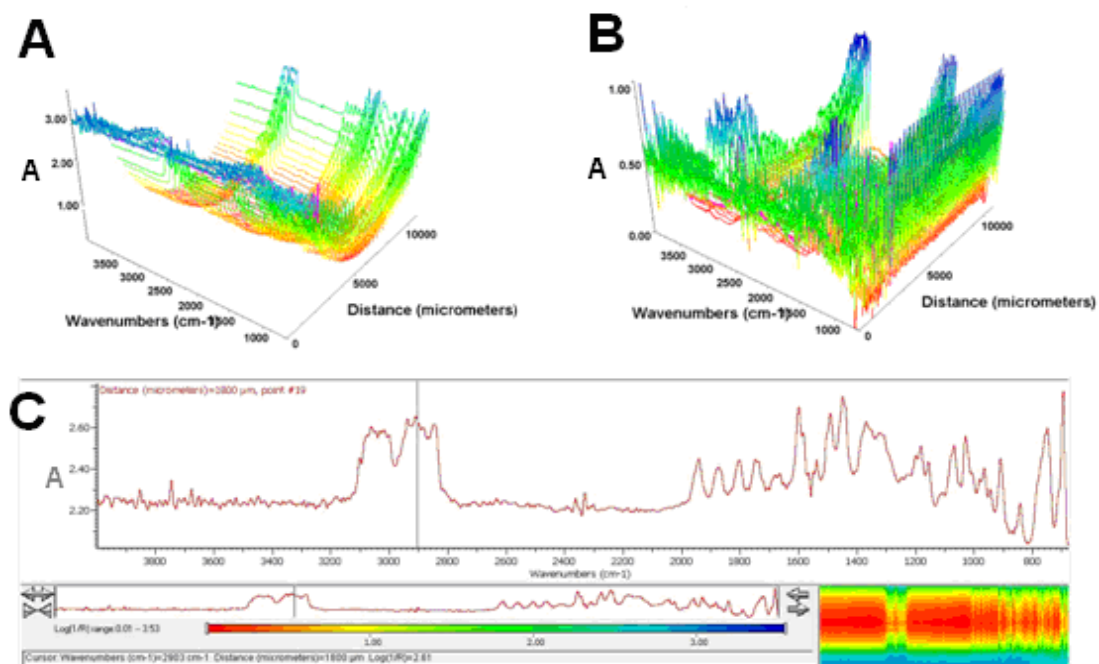
Jako nový způsob získání ATR spekter použitím nástavce pro „inverzní“ ATR, tedy přitlačení krystalu ve tvaru polokoule na vzorek, bylo pomocí liniových map zjišťováno, jestli lze získat stejně kvalitní spektra v celé oblasti krystalu (Obr.6). U ATR krystalu ze ZnSe (s indexem lomu $n = 2,4$) nedochází k distorzi spekter, jen u okraje krystalu asi 2000 μm od vrcholu krystalu, dochází ke zhoršení kvality spekter, zřejmě změnou intenzity infračerveného záření, která postupně klesá od středu krystalu ke kraji, to je patrné na Obr. 7 okno A. U ATR krystalu z Ge (s indexem lomu $n = 4$) dochází díky jeho vyššímu indexu lomu k distorzi spekter již ve vzdálenosti 1000 - 1500 μm od vrcholu krystalu (Obr. 8). Je tedy zřejmé, že měření je nejvýhodnější a spektra jsou nejkvalitnější v oblasti 1000 μm kolem vrcholu Ge krystalu a do 2000 μm od vrcholu ZnSe krystalu (Obr. 6).



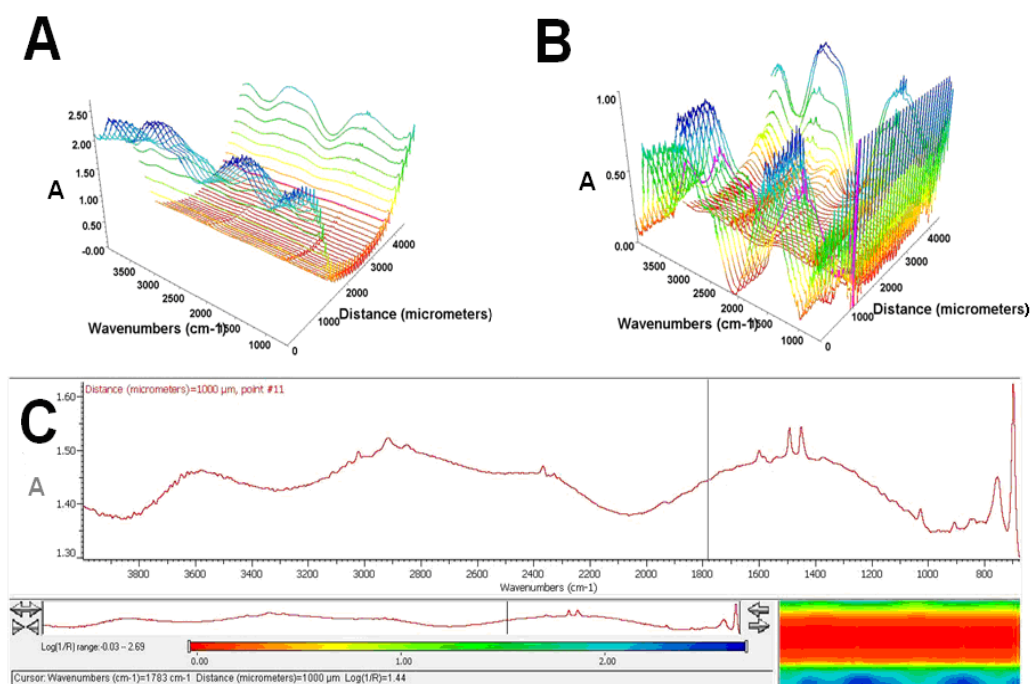
Obr. 5 ATR spektra vápenaté soli API zpracované do tří vzorků (lisovaná – modré spektrum, sypaná – fialové spektrum, tableta – červené spektrum) k posouzení polymorfních změn vlivem tlaku při jejich přípravě.



Obr. 6 Obraz povrchu „inverzního“ ATR krystalu a vyznačení vzdáleností od vrcholu krystalu do místa, kde dochází ke změnám kvality spekter pro krystaly z Ge a ZnSe



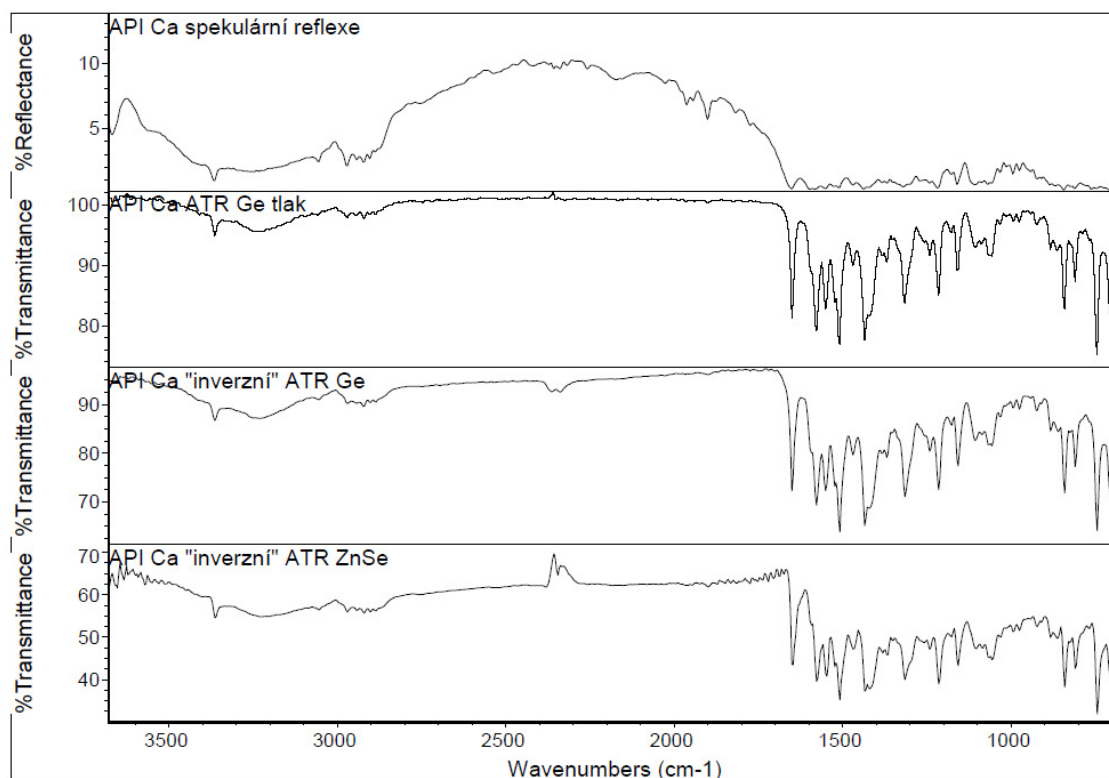
Obr. 7 Vliv tvaru ATR krystalu ZnSe na kvalitu spekter. Okno A je 3D zobrazení liniové mapy bez korekce základní linie. Okno B je 3D zobrazení liniové mapy s korekcí (normalize scale). V okně C je hraniční spektrum polystyrenu, viz. označení v Obr. 6 (cca 2000 μm od vrcholu krystalu).



Obr. 8 Vliv tvaru ATR krystalu Ge na kvalitu spekter. Okno A je 3D zobrazení liniové mapy bez korekce základní linie. Okno B je 3D zobrazení liniové mapy s korekcí (normalize scale). V okně C je hraniční spektrum polystyrenu z místa označení v Obr. 6 (cca 1000 μm od vrcholu krystalu).

Mapování řezu tablety infračervenou mikroskopií

Mapy vzorků tablet byly měřeny jak spekulární reflexí, tak technikami ATR. Spekulární reflexí získáme spektra, která jsou komplikovaná vlivem zrcadlové reflexe (Obr. 9), ale pro hodnocení mapy dostačující. Metodou zeslabené totální reflexe (ATR) získáme kvalitní spektra, proto můžeme snížit počet skenů jednotlivých spekter a tím celou analýzu urychlit. Na druhou stranu pohybem hrotu Ge krystalu po vzorku dochází k poškození vzorku. Stává se, že některá ze složek tablety se při měření uvolní a nalepí se na hrot krystalu. Získaná spektra jsou sice kvalitní a lépe se k nim přiřazují jednotlivé složky z knihovny než ke spektrům reflexním, ale pro úplnou interpretaci mapy máme díky nalepení složky na hrot krystalu informace částečně nebo zcela zkreslené.



Obr. 9 Porovnání spekter účinné látky měřené technikami: spekulární reflexe, ATR a „inverzní“ ATR s Ge a ZnSe krystalem.

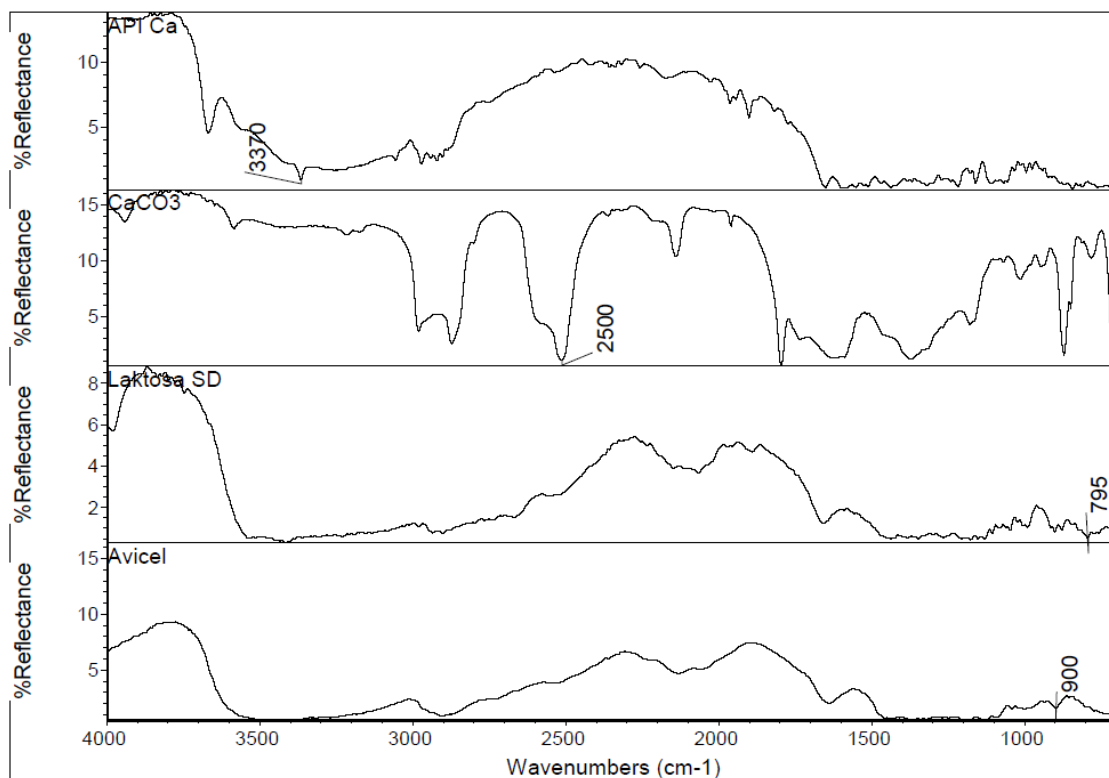
Při měření „inverzní“ ATR je nejdůležitější kontakt vzorku s krystalem, aby došlo k průniku záření do vzorku. Seříznutím tablety může být vytržena částice z povrchu vzorku, zvláště pokud byla tableta vyrobena granulací. V takovém případě vznikne mezi krystalem a vzorkem dutina, kde nelze spektrum měřit. Nedokonalosti kontaktu vzorku s krystalem se projevily horší kvalitou spektra a chemometrické

metody pak takovou komponentu neidentifikují. Výhodou tohoto způsobu měření je trvalé a neměnné připevnění krystalu na vzorek, kdy nedochází k jeho poškození.

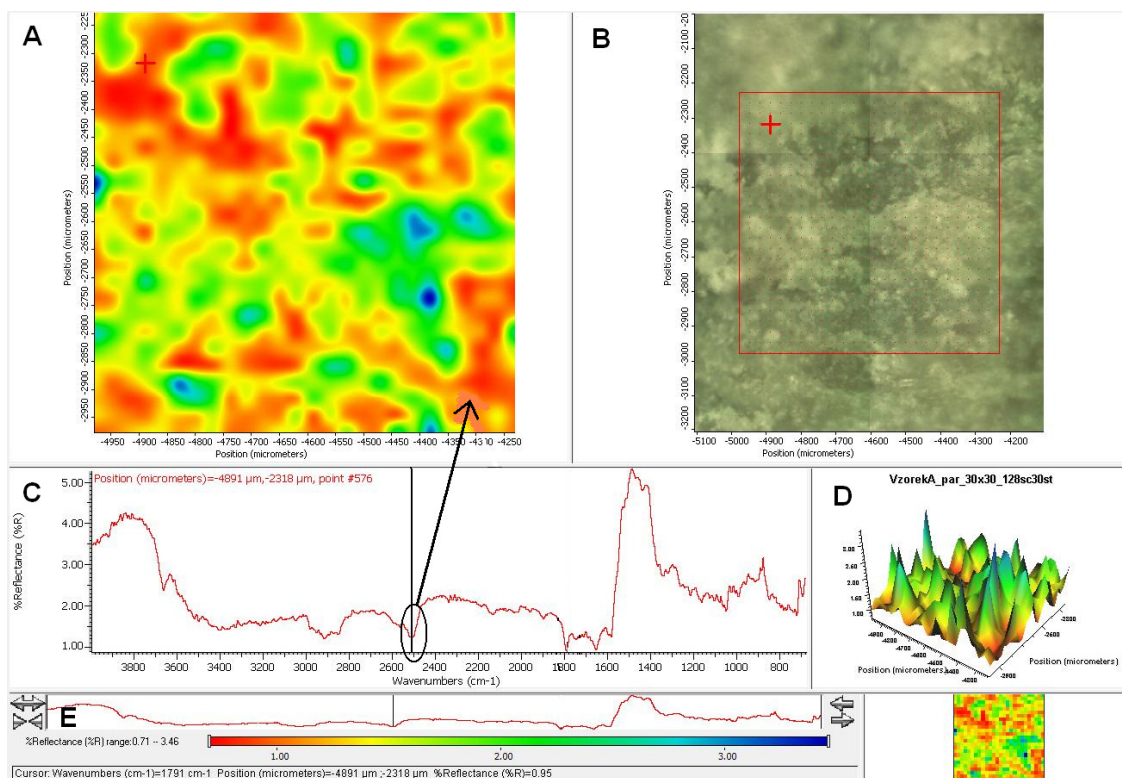
Pro využití v praxi, ke studiu povrchu tablety, se zdá nejvhodnější metodou spekulární reflexe. Spektra jsou sice výrazně komplikovanější, ale při využití chemometrických metod lze získat kvalitní výsledky, které nejsou ovlivněny instrumentací.

Touto technikou, tedy spekulární reflexí, byla měřena spektra čistých látek obsažených ve vzorku tablety (Obr.10). Ta byla následně využita k určení distribuce složek v naměřené mapě tablety A (Obr. 11) pomocí jednorozměrné analýzy, podle charakteristického pásu jednotlivých látek. Barvy v distribučních mapách se řídí škálou barev v Obr. 11 okno E, kdy červená barva označuje nejvyšší koncentraci dané látky ve vzorku podle vybraného spektrálního pásu. Distribuční mapy jednotlivých látek jsou uvedeny v obrázcích 12-15: API dle pásu při 3370 cm^{-1} (Obr. 12), uhličitán vápenatý dle pásu při 2500 cm^{-1} (Obr. 13), laktóza podle pásu při 795 cm^{-1} (Obr. 14) a celulóza podle pásu při 900 cm^{-1} (Obr. 15).

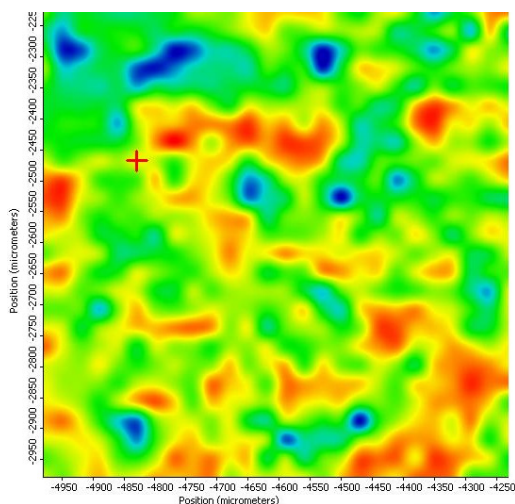
Vzhledem k horší kvalitě spekter sacharidů a časté podobnosti, bylo obtížné vizuálně přiřadit charakteristické pásy jednotlivým látkám. Např. spektra laktózy a celulózy jsou si velmi podobná a je těžké je pouhým okem v oblasti deformačních vibrací ($1500\text{-}600\text{ cm}^{-1}$) od sebe přesně rozlišit. To je patrné i z podobnosti jejich distribučních map (Obr. 14, 15). Proto je lepší využít vícerozměrnou analýzu, která pomocí matematických operací lépe rozpozná rozdíly mezi složkami. Z toho důvodu byla mapa vyhodnocena pomocí průvodce Wizards v programu Omnic. Pomocí analýzy hlavních komponent a porovnáním se spektry knihovny byly lokalizovány a identifikovány složky vzorku A (Obr. 16). V mapě tablety o rozměru $800 \times 800\text{ }\mu\text{m}$ bylo nalezeno 9 % API, 37 % uhličitánu vápenatého, 24 % laktózy a 30 % směsi celulózy. Jednotlivé druhy celulózy se nepodařilo rozlišit, jelikož jejich spektra si byla velmi podobná.



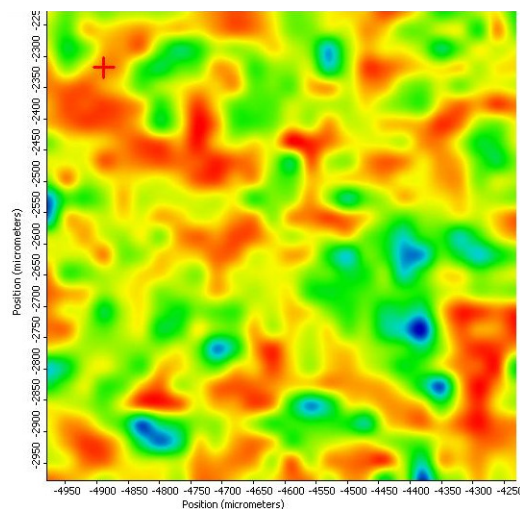
Obr. 10 Spektra čistých látek vzorku A měřená spekulární reflexí s vyznačením charakteristických pásů pro určení distribuce látek ve vzorku. Spektrum API s char. pásem při 3370 cm⁻¹, uhličitanu vápenatého s char. pásem při 2500 cm⁻¹, laktózy s char. pásem při 795 cm⁻¹ a Avicelu s char. pásem při 900 cm⁻¹.



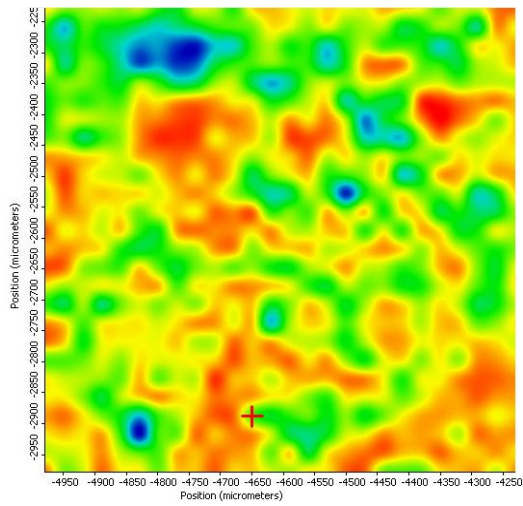
Obr. 11 Vzorek A měřený technikou spekulární reflexe. V okně B je vizuální obraz povrchu vzorku s vyznačením oblasti měřené mapy. Konturová mapa v okně A se mění podle intenzity vybraného pásu ze spektra zobrazeného ve spektrálním okně C. Pokud zvolíme pás charakterizující určitou složku, v okně A se zobrazí její distribuce v mapě podle škály barev (okno E). V tomto případě odpovídá distribuci pásu uhlíkatanu vápenatého při 2500 cm^{-1} . V okně D je 3D obraz plošné mapy.



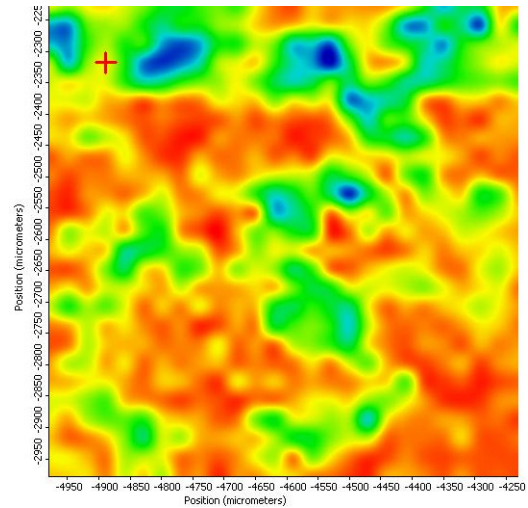
Obr. 12 Distribuční mapa API podle pásu při 3370 cm^{-1} .



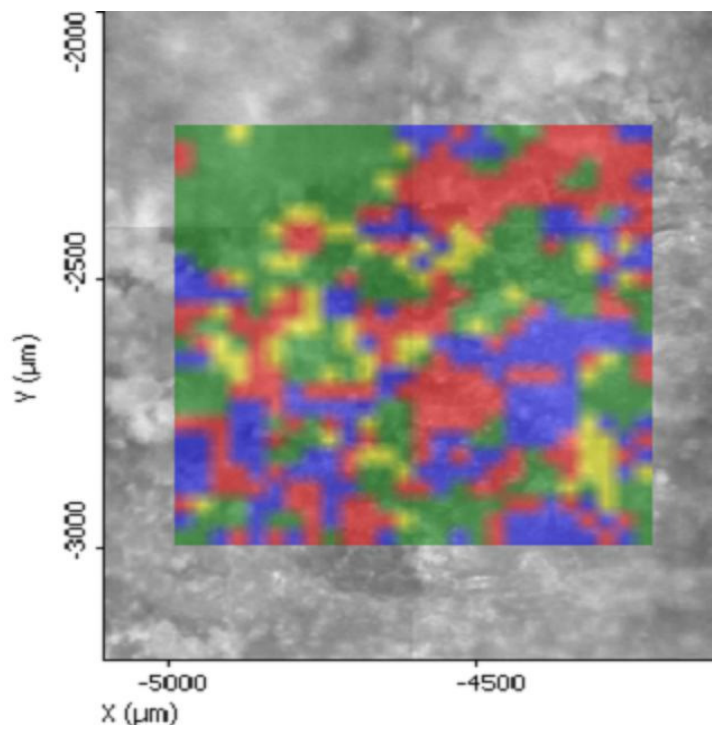
Obr. 13 Distribuční mapa uhlíkatanu vápenatého podle pásu při 2500 cm^{-1} .



Obr. 14 Distribuční mapa laktózy podle pásu při 795 cm^{-1} .



Obr. 15 Distribuční mapa celulózy podle pásu při 900 cm^{-1} .



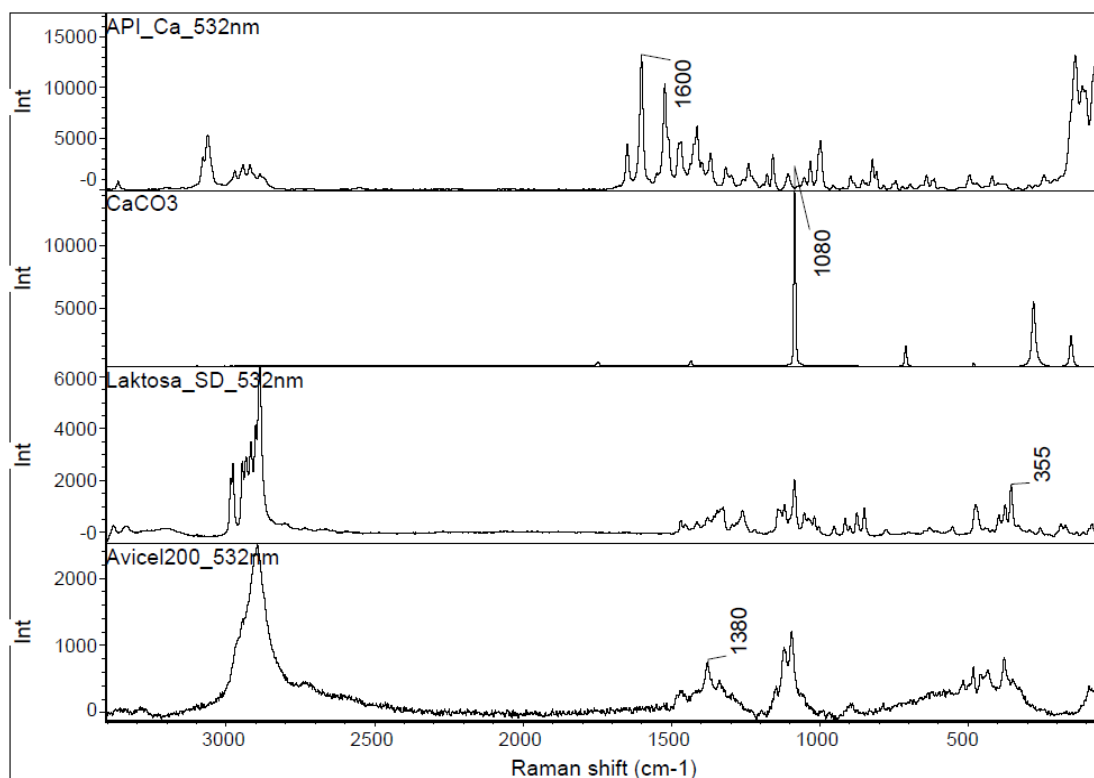
Obr. 16 Vyhodnocení naměřené mapy vzorku A (viz. obr. 11) pomocí programu Wizard: API – žlutá barva, uhličitán vápenatý - zelená, laktóza – modrá a celulózy – červená barva.

Ramanova mikroskopie

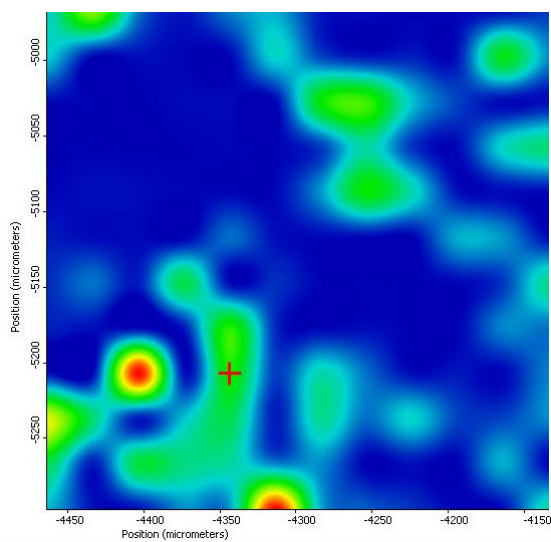
K mapování tablet bylo využito i Ramanovy mikroskopie. Nejprve byly zjištěny optimální podmínky měření. Všechny známé složky tablety byly měřeny třemi různými lasery. Všechny organické látky vykazovaly značnou fluorescenci pro všechny použité vlnové délky laserů. Fluorescence byla proto odstraněna pomocí softwarové funkce korekce fluorescence. Jako nejvhodnější pro další měření byl vybrán laser 532 nm, spektra měřená tímto laserem poskytovala nejintenzivnější Ramanův signál. Použitím objektivu s větším zvětšením a numerickou aperturou se zvýší rozlišení, proto byly mapy tablet měřeny objektivem 50x/0,75 NA.

Pro srovnání informací získaných mapováním infračervenou mikrospektroskopií a Ramanovou mikroskopií byl oběma metodami měřen vzorek A. K hodnocení map byla použita jednorozměrná analýza, z toho důvodu byla naměřena také spektra čistých složek (Obr. 17) a využita k tvorbě distribučních map API (Obr. 18), uhličitanu vápenatého (Obr. 19), laktózy (Obr. 20) a celulózy (Obr. 21) podle intenzit charakteristických pásů. Barvy distribuční mapy se řídí škálou barev podle intenzit Ramanova signálu. Se zvyšující se intenzitou signálu přechází barvy od modré po červenou a označují tak rozložení dané látky ve vzorku (Obr. 22).

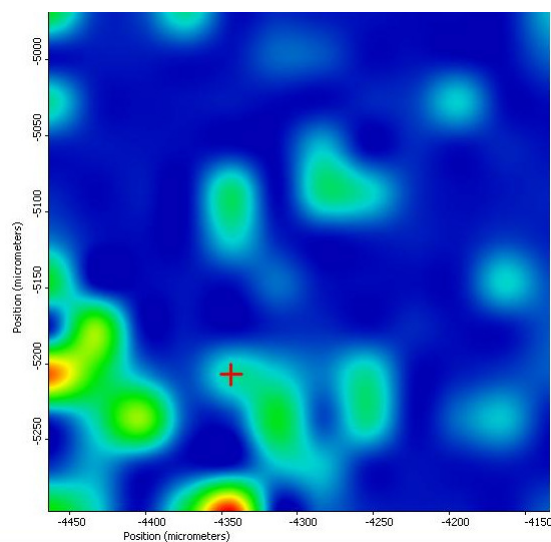
Lze porovnat hodnocení map vzorku A, který byl měřen oběma metodami. (Obr. 23). Paprsek laseru při měření Ramanovy spektroskopie můžeme zaostřit na stopu menší než 1 μm a získat tak mnohem podrobnější informace o distribuci látek ve vzorku. Nevýhodou ovšem je několikanásobně delší doba měření mapy. Z tohoto důvodu porovnávaná mapa měřená Ramanovou mikroskopií je jen částí plochy měřené infračervenou mikroskopií.



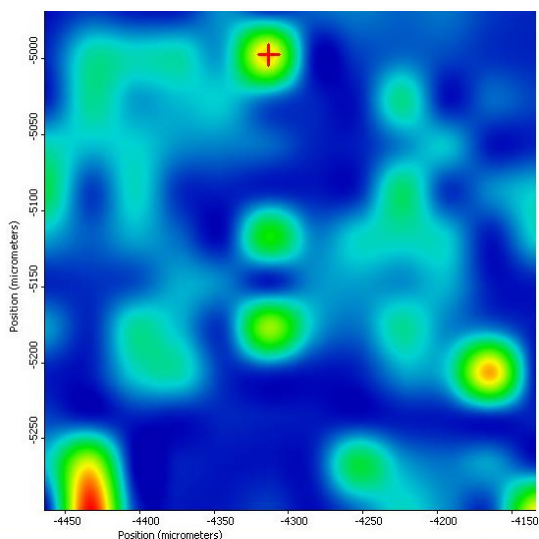
Obr. 17 Ramanova spektra čistých složek vzorku A s vyznačením charakteristických pásů. Spektrum API s char. pásem při 1600 cm^{-1} , uhličitanu vápenatého s char. pásem při 1080 cm^{-1} , laktózy s char. pásem při 355 cm^{-1} a Avicelu s char. pásem při 1380 cm^{-1} .



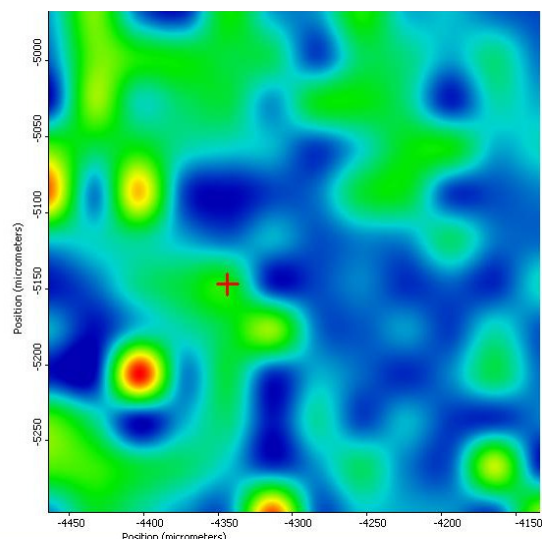
Obr. 18 Distribuční mapa API podle pásu při 1600 cm^{-1}



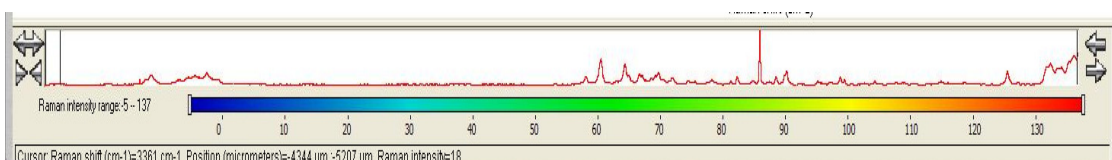
Obr. 19 Distribuční mapa uhličitanu vápenatého podle pásu při 1080 cm^{-1}



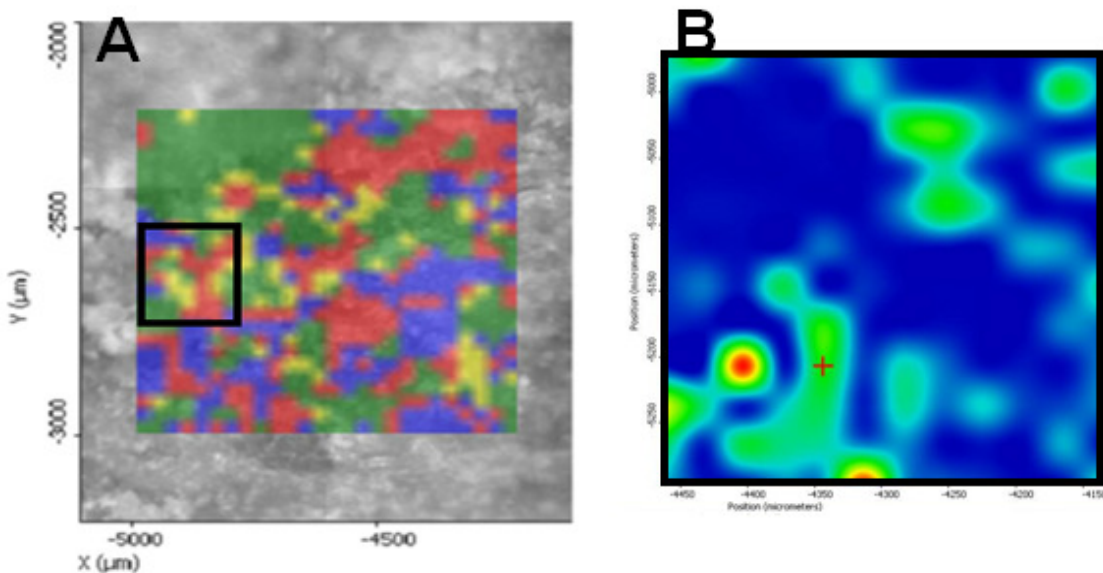
Obr. 20 Distribuční mapa laktózy podle pásu při 355 cm^{-1}



Obr. 21 Distribuční mapa Avicelu (celulózy) podle pásu při 1380 cm^{-1}

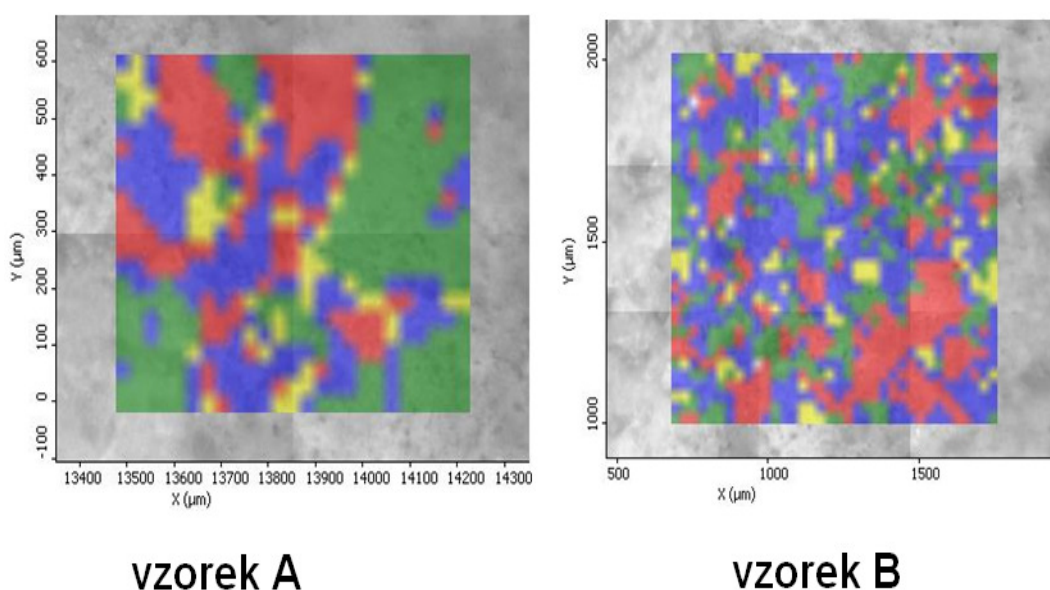


Obr. 22 Škála barev podle které se řídí barvy v distribučních mapách jednotlivých látek. Se stoupající intenzitou Ramanova signálu přechází od modré po červenou.



Obr. 23 Mapa vzorku A měřená infračervenou mikroskopií (obr. A) s vyznačením oblasti srovnávacího měření Ramanovou mikroskopií. V infračervené mapě je API označena žlutou barvou, uhličitán vápenatý zelenou, laktóza modrou a celulóza červenou barvou. Distribuční mapa API (obr. B) podle char. pásu při 1600 cm^{-1} .

Kromě určení složení tablet, je možné z naměřených map získat také informace o způsobu jejich výroby. Jednotlivé složky jsou v mapě vzorku A a B nepravidelně rozmístěny, tedy například API není obalena jen uhličitanem vápenatým, ale v jejím okolí se vyskytují i ostatní excipienty. Je tedy zřejmé, že před lisováním tablet, byly nejprve všechny složky smíchány, hněteny a z vytvořeného granulátu pak slisovány tablety. Různá velikost částic a shluků potvrzuje, že se jedná o granulaci a ne o přímou kompresi. Na obrázku 24 je zřejmé, že příprava vzorku A (generického léku) byla stejná jako u vzorku B (originálu léku). Liší se jen ve velikosti granulovaných zrn. Tyto závěry jsou zcela ve shodě se známým technologickým postupem při výrobě tablety A.



Obr. 24 Hodnocení map vzorku A a B měřených spekulární reflexí pro porovnání způsobu výroby tablet generického a originálního léku. Žlutá barva=API, zelená=uhličitan vápenatý, modrá=laktóza, červená=směs celulóz

5 ZÁVĚR

V této diplomové práci byly mapovány vzorky tablet (pevných lékových forem) metodami vibrační spektroskopie. Na základě studování vlivu různých parametrů měření na kvalitu získaných spekter byly vybrány optimální parametry pro následné měření map reálných vzorků. Vzorky byly především měřeny reflexními technikami infračervené spektroskopie: spekulární reflexí, technikou úplného vnitřního odrazu (ATR) a pomocí „inverzní“ ATR.

Vzájemným porovnáním jednotlivých způsobů měření a možností hodnocení naměřených map, byla vybrána nejvhodnější technika pro stanovení složení povrchu vzorku. Metodou spekulární reflexe byla získána spektra horší kvality, ale pomocí vhodných chemometrických postupů lze i z takto komplikovaných spekter získat kvalitní výsledek pro celou vybranou oblast vzorku. Metodami ATR a „inverzní“ ATR byla získána kvalitní spektra, která jsou pro určení jednotlivých složek ve vzorku čitelnější. Na druhou stranu, ATR techniky přináší řadu experimentálních rizik při analýze heterogenních vzorků. Ke stanovení distribuce složek v povrchu tablety, je pro studované lékové formy tedy nejvhodnější metoda spekulární reflexe.

Pro srovnání byly vzorky tablet měřeny i Ramanovou mikroskopií. Ta je velmi zajímavá z hlediska lepšího prostorového rozlišení, ale výrazně časově náročnější, proto byly mapy měřené touto technikou získány z menší oblasti studovaného vzorku tablety.

Z map generického a originálního léku naměřených spekulární reflexí, bylo na základě známého technologického postupu výroby generického léku ověřeno, že složení a způsob přípravy těchto tablet se neliší. Oba léky byly připraveny granulací s jediným rozdílem ve velikosti granulových zrn.

Z těchto závěrů jednoznačně vyplývá, že spektrální mapování je vhodným nástrojem analýzy ve farmaceutickém průmyslu. Kromě určení složení tablet, distribuce složek nebo zjištění velikosti částic ve směsi, je z naměřených map rozpoznatelná i technologie výroby tablet.

SEZNAM LITERATURE

- [1] Gowen A. A.; O'Donnell C. P.; Cullen P. J.; Bell S. E. J.: Recent applications of Chemical imaging to pharmaceutical process monitoring and quality control. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* **69**, 10-22 (2008).
- [2] Lewis E.N.; Treado P.J.; Reeder R.C.; Story G.M.; Dowrey A.E.; Marcott C.; Levin I.W.: Fourier Transform spectroscopic imaging using an infrared focal-plane array detector. *Analytical Chemistry* **67**, 3377-3381 (1995).
- [3] Salzer R.: Molecular imaging. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **389**, 1101-1102 (2007)
- [4] Šašić S.: Chemical imaging of pharmaceutical granules by Raman global illumination and near-infrared mapping platforms. *Analytica Chimica Acta* **611**, 73-79 (2008).
- [5] Rozo J. I. J.; Zarow A.; Zhou B.; Pinal R.; Iqbal Z.; Romanach R. J.: Complementary Near-Infrared and Raman Chemical Imaging of Pharmaceutical Thin Films. *Journal of Pharmaceutical Sciences* **100**, 4888-4895 (2011).
- [6] Chan K.L.A.; Kazarian S.G.: Fourier transform infrared imaging for high-throughput analysis of pharmaceutical formulations. *Journal of Combinatorial Chemistry* **7**, 185-189 (2005).
- [7] Krafft Ch.; Sobottka S. B.; Schackert G.; Salzer R.: Raman and infrared spectroscopic mapping of human primary intracranial tumors: a comparative study. *Journal of Raman Spectroscopy* **37**, 367-375 (2006).
- [8] Levin I. W.; Bhargava R.: Fourier Transform Infrared Vibrational Spectroscopic Imaging: Integrating Microscopy and Molecular Recognition. *Annual Review of Physical Chemistry* **56**, 429-474 (2005).
- [9] Windbergs M.; Haaser M.; Mcgoverin C. M.; Gordon K. C.; Kleinebudde P.; Strachan C. J.: Investigating the relationship between drug distribution in solid lipid matrices and dissolution behaviour using Raman spectroscopy and mapping. *Journal of Pharmaceutical Sciences* **99**, 1464-1475 (2010).

- [10] Clarke F. C.; Jamieson M. J.; Clark D. A.; Hammond S. V.; Jee R. D.; Moffat A.C.: Chemical Image Fusion. The Synergy of FT-NIR and Raman Mapping Microscopy To Enable a More Complete Visualization Of Pharmaceutical Formulations. *Analytical Chemistry* **73**, 2213-2220 (2001).
- [11] Reffner J. A.; Martoglio P. A.: Uniting microscopy and spectroscopy. In: *Practical Guide to Infrared Microspectroscopy*. Humecki H. J. (Ed.). Marcel Dekker, New York, 1995, p. 41-85.
- [12] Krishnan K.; Powell J. R.; Hill S. L.: Infrared microimaging. In: *Practical Guide to Infrared Microspectroscopy*. Humecki H. J. (Ed.). Marcel Dekker, New York, 1995, p. 85-111.
- [13] Messerschmidt R. G.: Minimizing optical nonlinearities in infrared microspectroscopy. In: *Practical Guide to Infrared Microspectroscopy*. Humecki H. J. (Ed.). Marcel Dekker, New York, 1995, p. 1-41.
- [14] Griffiths P. R.: Infrared and Raman Instrumentation for Mapping and Imaging. In: *Infrared and Raman Spectroscopic Imaging*. Salzer R.; Siesler H. W. (Eds.). Wiley-VCH Verlag, Weinheim, 2009, p. 3-62.
- [15] Sommers A.J.; Katon J.E.: Diffraction-Induced stray light in infrared microscopy and its effect on spatial resolution. *Applied Spectroscopy* **45**, 1633-1640 (1991).
- [16] Rafferty D.W.; Virnelson R.C.: A novel refractive FT-IR microscopy method. *Spectroscopy* **12**, 42-44 (1996).
- [17] Griffiths P.R.; de Haseth J.A.: *Fourier transform infrared spectrometry*. 2nd edn, Hoboken NJ, Wiley Interscience 2007.
- [18] Chan K.L.A.; Hammond V.S.; Kazarian S.G.: Applications of attenuated total reflection infrared spectroscopic imaging to pharmaceutical formulations. *Analytical Chemistry* **75**, 2140-2146 (2003).
- [19] Wessel E.; Vogel Ch.; Kolomiets O.; Hoffmann U.; Siesler H. W.: FT-IR and NIR spectroscopic imaging: Principles, practical aspects and applications in material and

pharmaceutical sciences. In: *Infrared and Raman Spectroscopic Imaging*. Salzer R.; Siesler H. W. (Eds.). Wiley-VCH Verlag, Weinheim, 2009, p. 297-343.

[20] Chan K.L.A.; Kazarian S.G.: New opportunities in micro and macro attenuated total reflection infrared spectroscopic imaging: spatial resolution and sampling versatility. *Applied Spectroscopy* **57**, 381-389 (2003).

[21] Gierlinger N.; Schwanninger M.: The potential of Raman microscopy and Raman imaging in plant research. *Spectroscopy* **21**, 69-89 (2007).

[22] Schmitt M.; Popp J.: Raman spectroscopy at the beginning of the twenty-first century. *Journal of Raman Spectroscopy* **37**, 20-28 (2006).

[23] Krafft C.: Bioanalytical applications of Raman spectroscopy. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **378**, 60-62 (2004).

[24] Kneipp K.; Kneipp H.; Itzkan I.; Dasari R.R.; Feld M.S.: Ultrasensitive chemical analysis by Raman spectroscopy. *Chemical Reviews* **99**, 2957-2975 (1999).

[25] Breitenbach J.; Schrof W.; Neumann J.: Confocal Raman spectroscopy: Analytical approach to solid dispersions and mapping of drugs. *Pharmaceutical Research* **16**, 1109-1113 (1999).

[26] Haaser M.; Windbergs M.; McGoverin C. M.; Kleinebudde P.; Rades T.; Gordon K. C.; Strachan C. J.: Analysis of matrix dosage forms during dissolution testing using Raman microscopy. *Journal of Pharmaceutical Sciences* **100**, 4452-4459 (2011).

[27] Owen Ch. A.; Selvakumaran J.; Notingher I.; Jell G.; Hench L. L.; Stevens M. M.: In vitro toxicology evaluation of pharmaceuticals using Raman micro-spectroscopy. *Journal of Cellular Biochemistry* **99**, 178-186 (2006).

[28] Krafft C.; Knetschke T.; Funk R.H.W.; Salzer R.: Identification of organelles and vesicles in single cells by Raman microspectroscopic mapping. *Vibrational Spectroscopy* **38**, 85-93 (2005).

- [29] Gendrin C.; Roggo Y.; Collet C.: Pharmaceutical applications of vibrational chemical imaging and chemometrics: A review. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **48**, 533-553 (2008).
- [30] Zhang L.; Henson M. J.; Sekulic S. S.: Multivariate data analysis for Raman imaging of a model pharmaceutical tablet. *Analytica Chimica Acta* **545**, 262-278 (2005).
- [31] Xue J.; Lee C.; Wakeham S. G.; Armstrong R. A.: Using principal component analysis (PCA) with cluster analysis to study the organic geochemistry of sinking particles in the ocean. *Organic geochemistry* **42**, 356-367 (2011).
- [32] Juan A.; Maeder M.; Hancewicz T.; Duponchel L.; Tauler R.: Chemometric Tools for Image Analysis. In: *Infrared and Raman Spectroscopic Imaging*. Salzer R.; Siesler H. W. (Eds.). Wiley-VCH Verlag, Weinheim, 2009, p. 65-106.
- [33] S. Hynie: *Speciální farmakologie. Díl 4. Látky ovlivňující kardiovaskulární systém*. 2.vyd. Praha, Karolinum 2001.
- [34] Lüllmann H.; Mohr K.; Wehling M.: *Pharmakologie und Toxikologie*. 15. přeprac. vyd. Praha, Grada Publishing 2004.
- [35] *Pharmindex Breviř*. Praha, MediMedia Information 2002.
- [36] *Technologie léků*. P. Komárek, M. Rabišková (Eds.). 3. přeprac.vyd. Praha, Galén 2006.
- [37] Elkhider N.; Chan K.L.A.; Kazarian S.G.: Effect of moisture and pressure on tablet compaction studied with FTIR spectroscopic imaging. *Journal of Pharmaceutical Sciences* **96**, 351-360 (2007).
- [38] Kazarian S.G.; Kong K.W.T.; Bajomo M.; van der Weerd J.; Chan K.L.A.: Spectroscopic imaging applied to drug release. *Food and Bioproducts Processing* **83**, 127-135 (2005).
- [39] Chan K.L.A.; Elkhider N.; Kazarian S.G.: Spectroscopic imaging of compacted pharmaceutical tablets. *Chemical Engineering Research and Design* **83**, 1303-1310 (2005).

- [40] van der Weerd J.; Kazarian S.G.: Combined approach of FTIR imaging and conventional dissolution tests applied to drug release. *Journal of Controlled Release* **98**, 295-305 (2004).
- [41] Virtanen S.; Antikainen O.; Rääkkönen H.; Yliruusi J.: Granule Size Distribution of Tablets. *Journal of Pharmaceutical Science* **99**:4, 2061-2069 (2010).
- [42] Shiraishi T.; Sano A.; Kondo S.; Yuasa H.; Kanaya Y.: Studies of granulation process of granules for tableting with a high speed mixer. II. Influence of particle size of active substance on granulation. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin* **43**:4, 654-659 (1995).
- [43] Shiraishi T.; Kondo S.; Yuasa H.; Kanaya Y.: Studies on the Granulation Process of Granules for Tableting with a High Speed Mixer. I. Physical Properties of Granules for Tableting. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin* **42**:4, 932-936 (1994).
- [44] Shiraishi T.; Sano A.; Kondo S.; Yuasa H.; Kanaya Y.: Studies of granulation process of granules for tableting with a high speed mixer. III. Analysis of the compression process. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin* **45**:8, 1312-1316 (1997).
- [45] Grunenberga A.; Henck J. O.; Siesler H. W.: Theoretical derivation and practical application of energy/temperature diagrams as an instrument in preformulation studies of polymorphic drug substances. *International Journal of Pharmaceutics* **129**, 147-158 (1996).
- [46] Chan K.L.A.; Fleming O.S.; Kazarian S.G.; Vassou D.; Chryssikos G.D.; Gionis V.: Polymorphism and devitrification of nifedipine under controlled humidity: A combined FT-Raman, IR and Raman microscopic investigation. *Journal of Raman spectroscopy* **35**, 353-359 (2004).
- [47] Borcka L.; Haleblian J. K.: Crystal polymorphism of pharmaceuticals. *Acta Pharmaceutica Jugoslavica* **40**, 71-94 (1990).
- [48] Kalinkova G. N.: Infrared spectroscopy in pharmacy. *Vibrational Spectroscopy* **19**, 307-320 (1999).