

**Univerzita Karlova v Praze**  
**Farmaceutická fakulta v Hradci Králové**  
**Katedra farmaceutické chemie a kontroly léčiv**

**Zentiva, k.s., Praha**  
**Oddělení vývoje, Laboratoře pevné fáze**

**VYUŽITÍ INFRAČERVENÉ**  
**A RAMANOVY SPEKTROMETRIE**  
**V PREFORMULAČNÍM VÝVOJI LÉČIV**  
**(Rigorózní práce)**

**Mgr. Jiří Klimeš**  
**Hradec Králové 2010**

## **Poděkování**

Mé poděkování patří Ing. Tomáši Pekárkovi, Ph.D., Ing. Jaroslavu Havlíčkovi, CSc., Doc. Ing. Jiřímu Dohnalovi, CSc, MBA a PharmDr. Petře Kovaříkové, Ph.D., za jejich odbornou supervizi a cenné rady k vypracování této rigorózní práce.

Zároveň mé díky patří i Ing. Zuzaně Mandelové a Ing. Marcele Tkadlecové, CSc., za jejich věcné rady, připomínky a celkovou pomoc při sepsání této rigorózní práce.

Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem, které jsem vypracoval samostatně. Veškerá literatura a další zdroje, ze kterých jsem při zpracování čerpal, jsou uvedeny v seznamu literatury a v práci řádně citovány.

Mgr. Jiří Klimeš

# Obsah

<i>Seznam zkratek</i> .....	5
<b>1. Teoretická část</b> .....	<b>6</b>
<i>Úvod</i> .....	6
<i>1.1. Předformulační (preformulační) vývoj</i> .....	7
<i>1.2. Analytické metody používané při preformulačním vývoji léčiv</i> .....	8
Infračervená a Ramanova spektrometrie, úvod.....	9
1.2.1. Infračervená spektrometrie .....	10
1.2.1.1. IR spektrometrie ve střední oblasti .....	11
1.2.1.1.1. Teorie MIR (4000 – 200 cm <sup>-1</sup> ).....	11
1.2.1.1.2. Instrumentace MIR, základní vztahy .....	11
1.2.1.1.3. Techniky měření MIR; transmisní a reflexní měření.....	13
1.2.1.1.4. Využití MIR spektrometrie ve farmacii .....	14
1.2.1.2. IR spektrometrie v blízké oblasti (12800 – 4000 cm <sup>-1</sup> ) .....	15
1.2.2. Ramanova spektrometrie.....	15
1.2.2.1. Teorie Ramanovy spektrometrie .....	15
1.2.2.2. Instrumentace Ramanovy spektrometrie.....	16
1.2.2.3. Použití Ramanovy spektrometrie ve farmacii.....	17
<i>1.3. Vývoj přípravku v pevné fázi, polymorfismus</i> .....	18
1.3.1. Kokrystaly .....	19
<i>1.4. Farmaceutické pomocné látky</i> .....	20
1.4.1. Celulóza, mikrokrystalická .....	20
1.4.2. Hydroxypropylcelulóza.....	21
1.4.3. Laktóza .....	21
1.4.4. Meglumin .....	22
1.4.5. Sorbitol.....	22
<i>1.5. Účinné látky</i> .....	23
1.5.1. Telmisartan.....	23
1.5.2. Clopidogrel.....	25

<b>2. Cíl práce.....</b>	<b>27</b>
<b>3. Experimentální část.....</b>	<b>28</b>
3.1. <i>Seznam instrumentace, chemikálií a farmaceutických substancí.....</i>	28
3.2. <i>Nastavení instrumentů, příprava vzorků.....</i>	30
3.2.1. IR instrumentace a příprava vzorků.....	30
3.2.2. Instrumentace Ramanova spektrometru a příprava vzorků.....	33
<b>4. Výsledky a diskuze.....</b>	<b>34</b>
4.1 <i>IR spektra.....</i>	34
4.1.1 Spektra účinných látek; telmisartan a clopidogrel.....	34
4.1.2 Studium případných kvalitativních změn API ve formulovaných přípravcích pomocí FT – IR transmisním měřením.....	38
4.1.2.1. Přípravek s obsahem clopidogrelu.....	39
4.1.2.2. Přípravek s obsahem telmisartanu.....	41
4.1.3 Studium případných kvalitativních změn API ve formulovaných přípravcích pomocí FT-IR ATR.....	43
4.1.3.1 Přípravek s obsahem clopidogrelu.....	44
4.1.3.2. Přípravek s obsahem telmisartanu.....	45
4.2 <i>Ramanova spektra.....</i>	46
4.2.1. Studium případných kvalitativních změn API ve formulovaných přípravcích pomocí Ramanovy spektrometrie.....	48
4.2.1.1 Přípravek s obsahem clopidogrelu.....	49
4.2.1.2 Přípravek s obsahem telmisartanu.....	50
<b>5. Závěr.....</b>	<b>51</b>
<i>Seznam literatury.....</i>	52
<i>Abstrakt.....</i>	55
<i>Abstract.....</i>	56

## Seznam zkratek

ACE	enzym konvertující angiotensin
ASA	kyselina acetylsalicylová
API	účinná látka (Active Pharmaceutical ingredient)
cox-2	Cyklooxygenáza II
DMSO	Dimethylsulfoxid
DSC	Diferenční skenovací kalorimetrie (Differential Scanning Calorimetry)
FDA	Food and Drug Administration
FT	Fourierova transformace
GIT	Gastrointestinální trakt
GP IIb/IIIa	Glykoprotein IIg/IIIa (vazebný protein pro fibrinogenu)
GMP	Good Manufacturing Practise (Správná výrobní praxe)
HPC	Hydroxypropyl celulóza
IR / IČ	Infrared / Infračervený
NMR	Nukleární magnetická resonance
NSAID	Nesteroidní antiflogistika
PRE-V	Preformulační vývoj
PRE-S	Preformulační studie
RAA	renin-angiotensin-aldosteronový systém
ss NMR	Solid State NMR (NMR v pevné fázi)
Tbl	tableta
TG	Termogravimetrie
UV-VIS	Ultrafialová – viditelná oblast

# 1. TEORETICKÁ ČÁST

## Úvod

Narůstající nároky na zdravotní péči vytvářejí velký tlak na dostupné finanční zdroje, a je proto důležité, aby se léky využívaly racionálně.

Jelikož se náklady na vývoj zcela nového léčivého přípravku (s inovativní molekulou) stále zvyšují, odráží se tato skutečnost i v jeho ceně. (V roce 2003 byly průměrné náklady na vývoj jednoho inovativního přípravku 900 milionů USD, v tomto roce se tato částka pohybuje kolem hodnoty 1,5 miliard USD<sup>1</sup>). Jelikož dostupnost takovéto terapie by byla velice omezená, přichází po vypršení patentového krytí inovativního přípravku generický přípravek, jenž má shodné kvalitativní a kvantitativní složení s ohledem na účinnou látku a shodnou lékovou formu s referenčním přípravkem.

S přibývajícím požadavky na kvalitu a bezpečnost léčiv se však i zvyšují nároky na analytická hodnocení, což má dopad na rychlost uvedení nových, ale i generických léčiv na trh. Na tento fakt je poukázáno i Světovou zdravotnickou organizací<sup>2</sup>.

V rámci vývoje/preformulačního vývoje je tedy kladen velký důraz na použití rychlých, přesných a versatilních analytických metod. V dnešní době bezesporu mezi takovéto metody řadíme metody pevné fáze. Právě pro jejich jednoduchost provedení a možnosti získání dalších informací, jako jsou informace o polymorfismu účinné látky, velikosti částic, jejich distribuci, informace o stabilitě konečného přípravku a mnoho dalších. Tyto informace jsou v rámci formulace přípravku naprosto nepostradatelné.

Mezi nejpoužívanější metody pevné fáze patří NMR (v pevné fázi), nové metody infračervené spektrometrie, Ramanova spektrometrie, metody termických analýz, RTG strukturní analýzy a další.

## 1.1. Předformulační (preformulační) vývoj

Preformulační studie jsou jedním z kroků na cestě od objevu biologicky aktivní látky k jejímu využití jakožto léčivého přípravku. Poté, co se vypracovala určitá syntéza nebo izolace léčivé látky a způsob jejího analytického hodnocení, když proběhly farmakologické, toxikologické a preklinické testy přichází čas formulovat léčivý přípravek<sup>3</sup>.

Jak již bylo nastíněno, celý tento postup se liší, bude-li se jednat o přípravek inovativní nebo generický. V případě generického přípravku, kdy již strukturu a účinnost léčivé látky známe, se neprovádí farmakologické, toxikologické a klinické studie jako takové, shoda je pak dokazována studii bioekvivalenčními. Zjednodušení celého postupu vývoje generického přípravku se pak odráží i v jeho ceně. Ta může být o více než 80 % nižší než cena originálu. Této skutečnosti držitelé rozhodnutí o registraci v Čechách mnoho nevyužívají, jelikož generika jsou u nás obecně drahá v porovnání s vyspělejšími zeměmi EU.

Cílem preformulačního vývoje (PRE-V) je pak získat potřebné informace k formulaci přípravku, který je stabilní, vhodný k hromadné výrobě a je v souladu s požadavky terapie. PRE-S se orientují na zjištění nebo posouzení těchto parametrů léčiva<sup>3</sup>:

### 1. Organoleptické vlastnosti a čistota

Nepříjemné organoleptické vlastnosti vyžadují použití korigentů, nebo výběr zcela jiné lékové formy, která tyto vlastnosti překrývá.

Již malé stopy nečistot (které jsou přijatelné) mohou být zdrojem těžkostí při formulaci léků a případných inkompatibilit<sup>3</sup>.

### 2. Velikost částic, jejich povrch a tvar

V rámci technologického hlediska existují určité optimální parametry pro bezproblémovou formulaci<sup>3</sup>.

### 3. Rozpustnost a rychlost rozpouštění

Zvláštní pozornosti je při PRE-V dáno léčivům s omezenou rozpustností, především léčivům nerozpustným ve vodě<sup>3</sup>.

### 4. Rozdělovací a ionizační konstanta

Limitujícím faktorem pro biologickou rozpustnost je absorpce léčiva, proto je důležité znát rozdělovací konstantu/ koeficient (pro systém voda/n-oktanol).



Pro léčiva absorbovaná z gastrointestinálního traktu (GIT) je pak důležité znát ionizační konstantu ( $pK_a$ ) léčiva, vezmeme-li v potaz rozdílné hodnoty pH v různých částech GIT<sup>3</sup>.

## **5. Krystalové vlastnosti, případná polymorfie**

Schopnosti látky existovat ve více krystalických soustavách (polymorfii) je věnována velická pozornost a to nejen z hlediska technologického, ale i marketingového, neboť příslušná krystalická modifikace se stává předmětem patentového krytí.

Z technologického hlediska je třeba si uvědomit, že různé krystalové modifikace mohou mít různou teplotou tání a především rozdílnou rozpustností a rychlostí rozpouštění<sup>3</sup>.

## **6. Chemická, fyzikální a mikrobiologická stálost**

Stálost nové účinné látky se ověřuje na základě stresových (zátěžových) zkoušek, při kterých se sleduje rozklad za zvýšené teploty, v kyselém a zásaditém prostředí a/nebo působením UV záření a oxidačních činidel.

Rozhoduje se o potřebnosti stabilizačních přísad (chemických, fyzikálních a protimikrobních).

Stálost léčivého přípravku se ověřuje a dokazuje na základě zrychlených a dlouhodobých stabilitních studií<sup>3,4</sup>.

PRE-S vyúsťuje do formulace léčivého přípravku. Výsledkem je přesné složení přípravku, výrobní předpis, provozní reglement, základ podnikové normy a konečný design léčiva. Následuje výroba v poloprovozním měřítku a tzv. scale-up, tedy přechod na podmínky hromadné výroby<sup>3</sup>.

## **1.2. Analytické metody používané při preformulačním vývoji léčiv**

V rámci vývoje farmaceutického přípravku je třeba přesně určit kvalitativní i kvantitativní vlastnosti účinných i pomocných látek, zaměřit se na jejich stabilitu, odhalení případných interakcí a inkompatibilit. Za tímto účelem se využívá široká škála analytických metod. Prioritou při výběru konkrétní metody je pak její účinnost, přesnost a v neposlední řadě rychlost a obtížnost provedení analýzy.

Mezi nejpoužívanější metody patří separační metody (chromatografické a metody kapilární elektroforézy), hmotnostní spektrometrie, UV-VIS spektrometrie a metody, při nichž se vzorek měří v pevné fázi. Velikou výhodou metod pevné fáze je jednoduchost jejich provedení (minimalizuje se nebo zcela odpadá příprava vzorku). Pomocí metod pevné fáze snadno určíme mnoho vlastností látky nebo směsi látek (léková forma), jež jsou pro formulaci léčiva esenciální, jako např. polymorfie, tvar, velikost a rozložení částic, inkompatibilita v lékové formě a její stabilitu<sup>5, 6</sup>.

Mezi tyto metody patří tedy především:

- Infračervená spektrometrie, Ramanova spektrometrie
- Nukleární magnetická rezonance<sup>7</sup>
- Metody termické analýzy (DSC<sup>8</sup>, TG, Mikrokalorimetrie)
- RTG prášková analýza (RTG strukturní analýza)
- Mikroskopické metody (optické, termooptické)
- Mikrometrie (granulometrie, povrch částic, porozita)
- Dynamická sorpce par (DVS)
- Stanovení rozpustnosti a rozpouštěcí rychlosti<sup>5</sup>

## **Infračervená a Ramanova spektrometrie, úvod**

Spektrometrie v infračervené (IR) oblasti je optická metoda založená na absorpci elektromagnetického záření látkou. Na rozdíl od UV, nemá IR záření dostatek energie, aby vyvolalo energetické přechody elektronů. V závislosti na změnách dipólového momentu samotné molekuly dochází k jejím změnám na úrovni vibračně rotačních energetických stavů<sup>9, 10</sup>.

Díky mnoha výhodám, které metody IR spektrometrie skýtají (rychlost analýzy, jednoduchá příprava vzorku), je IR spektrometrie ve farmaceutickém průmyslu nepostradatelnou metodou v rámci rutinní kontroly kvality i ve vývoji<sup>10</sup>.

Díky IR spektrometrii získáme informace o strukturním uspořádání molekuly, funkčních skupinách, kvalitativním i kvantitativním složení směsí a to jak pevných tak kapalných vzorků (včetně suspenzí a emulzí)<sup>9, 10</sup>.

Komplementární metodou k IR spektrometrii je Ramanova spektrometrie, která nabízí stejné možnosti, navíc umožňuje měření přes obaly (sklo, plast) a ve vodném prostředí<sup>10</sup>.

Obě techniky jsou uznávány státními autoritami (EMEA, FDA) jako metody vhodné pro analýzu léčiv<sup>10, 11, 12</sup>.

### 1.2.1. Infračervená spektrometrie

IR spektrometrie je založena na interakci IR záření s hmotou. IR záření je elektromagnetické vlnění, jeho energie je kvantována. Každé kvantum energie tvoří jednu částici (fotonů).

$$\text{Platí tedy vztah: } E = h \cdot \nu = \frac{h \cdot c}{\lambda} \quad \nu = \frac{c}{\lambda} \quad \nu = \frac{1}{\lambda}$$

$c$  - rychlost

$\nu$  - vlnčet [ $\text{cm}^{-1}$ ]

$\lambda$  - vlnová délka

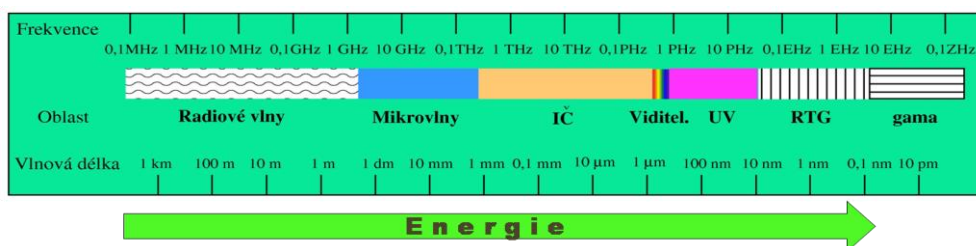
$h$  – Planckova konstanta

$\nu$  - kmitočet (frekvence) [Hz]

$E$  - energie záření

IR záření je vymezeno vlnovými délkami  $\lambda = 0,78\text{-}1000 \mu\text{m}$ , častěji se používá jednotek vlnčetů ( $\nu = 12800$  až  $5 \text{ cm}^{-1}$ )<sup>10</sup>.

Celé elektromagnetické spektrum a vlnové délky/frekvence jeho jednotlivých částí jsou naznačeny na Obr. 1<sup>10</sup>



**Obr. 1:** vlnové délky, frekvence a energie jednotlivých částí spektra<sup>10</sup>

Oblast IR je rozdělena na tři části:

- I. blízkou IR oblast  $12800 - 4000 \text{ cm}^{-1}$  ( $0,78 - 2,50 \mu\text{m}$ ); **near-infrared, NIR**
- II. střední IR oblast  $4000 - 200 \text{ cm}^{-1}$  ( $2,50 - 50 \mu\text{m}$ ); **mid-infrared, MIR**
- III. vzdálenou IR oblast  $200 - 5 \text{ cm}^{-1}$  ( $50 - 1000 \mu\text{m}$ ); **far-infrared, FIR**

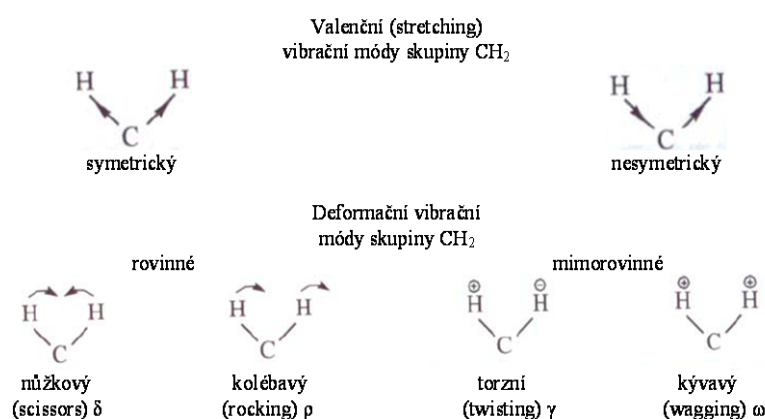
Oblast FIR se ve farmaceutickém průmyslu rutinně nepoužívá, důležitější jsou oblasti MIR, kde leží většina fundamentálních vibrací a oblast NIR, jež má nejvyšší energii (Ve spektru NIR se objevují kombinační přechody a svrchní tóny neboli overtóny)<sup>9, 10</sup>.

### 1.2.1.1. IR spektrometrie ve střední oblasti

#### 1.2.1.1.1. Teorie MIR (4000 – 200 cm<sup>-1</sup>)

Každá vazba v molekule vibruje určitou frekvencí, z IR záření jsou pohlcovány ty oblasti záření, jejichž frekvence odpovídá frekvencím vibrací vazeb v molekule. Podmínkou vzniku charakteristického pásu je nenulová změna dipólového momentu podle normální koordináty<sup>10</sup>.

Rozlišujeme dva základní typy vibrací; valenční (změna délky vazby) a deformační (změna vazebného úhlu). Jednotlivé podtypy (vibrační módy) jsou znázorněny na Obr. 2<sup>10, 13</sup>.



Obr. 2: Vibrační módy<sup>10, 13</sup>

V rozsahu vlnočtu 4000 – 1500 cm<sup>-1</sup> dochází k vibracím příslušných funkčních skupin, v intervalu 1500 – 200 cm<sup>-1</sup> dochází ke skeletálním vibracím (následkem vibrací mnoha atomů v molekule). Na základě toho se dají strukturně odlišit velice podobné molekuly; neexistují dvě různé sloučeniny s identickými IR spektry<sup>10</sup>.

#### 1.2.1.1.2. Instrumentace MIR, základní vztahy

Všechny optické prvky musí být z IR transparentního materiálu (KBr, NaCl, ZnSe).

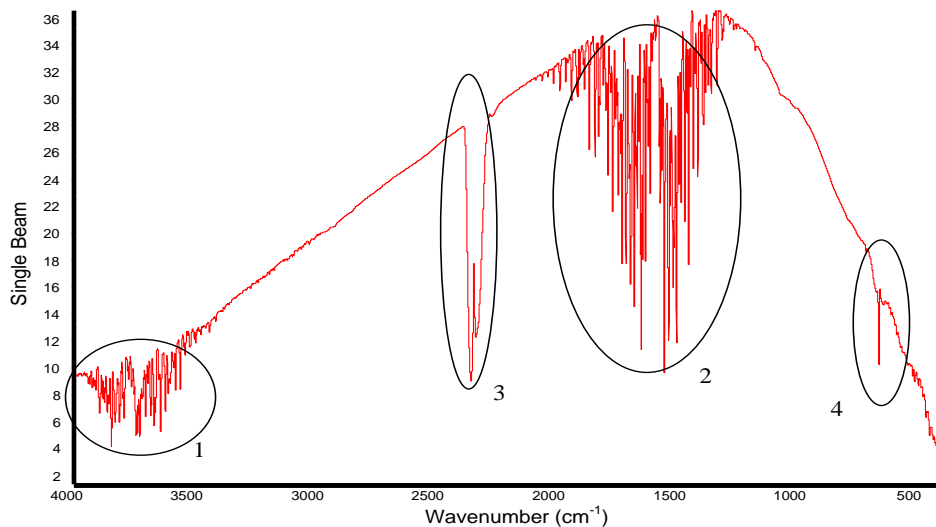
Přístroj je složen ze tří základních částí:

1. Zdroj záření (karbid křemíku, NiCr odporové vlákno)
2. Detektor (*termální systém* - deuterovaný triglycin síranový detektor a *kvantový systém* - tellurid kadmato rtuťný (Hg<sub>x-1</sub>Cd<sub>x</sub>Te, HCT) detektor).
3. Interferometr (Dříve užití dispersních systémů – hranol, mřížka - dnes na bázi Fourierovy transformace)<sup>9, 10</sup>.

### Pozn.: Fourierova transformace

Interferometr moduluje IR záření za tvorby interferogramu. Pro přepočítání interferogramu na spektrum je potřeba převést časovou doménu reprezentovanou interferogramem na doménu frekvencí (spektrum). Ve Fourierově transformaci se pro aplikaci v IČ spektrometrii používají dva parametry. Jedním z nich je doplnění interferogramu nulami (zero filling), které slouží k získání interpolovaných hodnot spektra. Druhým parametrem je apodizace. Nutnost použít apodizaci spočívá v tom, že interferogram je v omezených mezích, nikoliv v intervalu  $(-\infty; +\infty)$ . Apodizační funkcí se „ořezává“ interferogram a její volba závisí na cíli měření. Jinou zvolíme, chceme-li docílit vysokého rozlišení a jinou, lze-li tolerovat různě velkou ztrátu rozlišení<sup>10</sup>.

Jelikož voda (vzdušná vlhkost) a oxid uhličitý poskytují v IR značnou odezvu, je potřeba měřit před analýzou vzorku pozadí (background); *Obr. 3*.



*Obr. 3*<sup>10</sup>: Pozadí - background; 1,2 – vzdušná vlhkost; 3, 4 – oxid uhličitý)

Při průchodu světelného paprsku o intenzitě  $\Phi_0$  vrstvou absorbujícího prostředí tloušťky  $l$  se část absorbuje a část o intenzitě  $\Phi$  vychází.

Platí následující vztahy<sup>10, 14, 15</sup>:  $T = \frac{\Phi}{\Phi_0}$        $A = \log \frac{1}{T}$

$T$  – transmitance                       $A$  – absorbance                       $100 \cdot T$  – propustnost [%]

Pro reflexní měření se mnohdy používá reflektance  $R$  [%], která je definovaná jako tok reflektovaného (odraženého) záření  $\Phi_R$  vůči toku vstupního záření  $\Phi_0$ :

$$R = \frac{\Phi_R}{\Phi_0} \quad \text{vztah mezi reflektancí a absorbancí: } A = \log \frac{1}{R}$$

Platí také Lambert-Beerův zákon;  $A = \varepsilon \cdot c \cdot l$

(Absorbance je lineární funkcí koncentrace)

$\varepsilon$  – molární absorpční koeficient [ $\text{l} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ]

$c$  – molární koncentrace [ $\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$ ]

$l$  – tloušťka vrstvy [cm]

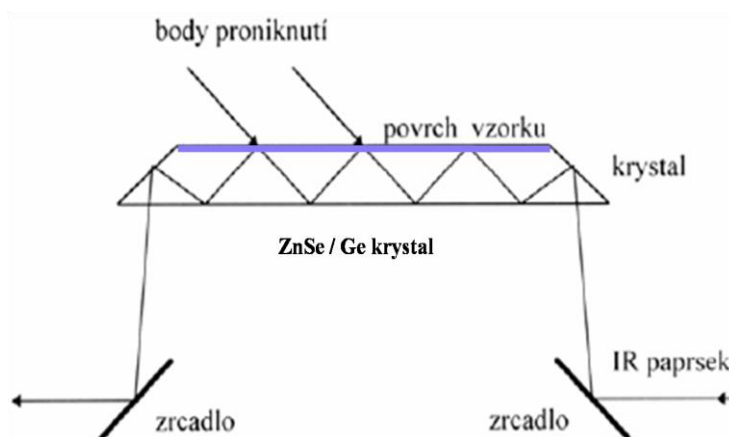
### 1.2.1.1.3. Techniky měření MIR; transmisní a reflexní měření

#### Transmisní měření

Touto technikou zjišťujeme zeslabení zářivého toku po průchodu vzorkem. Používá se k měření plynů, kapalin a pevných látek. Pro měření vzorků v roztoku se nejčastěji používají halogenovaná rozpouštědla (chloroform, tetrachlormetan), pro měření látek v pevném stavu je to pak suspenze v parafinovém oleji nebo bromid draselný (vylisovaná tableta)<sup>9, 10</sup>.

## Reflexní měření

Nejvíce rozšířené reflexní měření využívá techniky ATR (Attenuated Total Reflection – zeslabený úplný (vnitřní) odraz). Uspořádání ATR techniky – viz. Obr. 4



Obr. 4; FT-IR ATR<sup>10</sup>

Tenká vrstva vzorku je přitlačena na krystal (ZnSe, Ge, Si nebo diamant). IR záření je v krystalu odraženo ke vzorku, kde dochází k incidenci s tenkou (1  $\mu\text{m}$ ) vrstvou vzorku a je odraženo zpět na krystal, kde se láme a optickou soustavou pokračuje k detektoru. Lom na krystalu může být násobný nebo pouze jeden.

Tímto způsobem můžeme získat spektrum konkrétní plochy, která je přitlačena ke krystalu, na rozdíl od transmisního měření, kdy získáváme „průměrné“ spektrum.

Pomocí ATR lze měřit pevné vzorky, kapaliny i polotuhé materiály<sup>10, 16</sup>.

### 1.2.1.1.4. Využití MIR spektrometrie ve farmacii

Kromě klasického ověřování struktury/totožnosti a čistoty API a pomocných látek na úrovni vstupních surovin, meziproductů a ve finálním produktu, je další velikou předností IR spektrometrie ve střední oblasti možnost určení polymorfie a určení případných interakcí, inkompatibilit.

Dále lze metody velice dobře využít k rozlišení různých solí jedné látky.

Nepostradatelné informace potřebné v rámci preformulačního vývoje získáváme spojením IR spektrometrie s IR mikroskopem, za použití tzv. *mappingu* nebo *imagingu*. Tato technika poskytuje informace o velikosti částic léčivé látky v tabletě a jejich distribuci, o rovnoměrnosti potahu apod.<sup>9, 10</sup>.

### 1.2.1.2. IR spektrometrie v blízké oblasti (12800 – 4000 cm<sup>-1</sup>)

Jak již bylo naznačeno, IR spektrometrie v této oblasti je spojena s energeticky vyššími přechody – kombinační a overtóny, nikoli fundamentálními, jež jsou dominantní pro MIR.

Největší výhodou NIR spektrometrie je možnost měřit i přes skleněné a některé další transparentní obaly, umožňuje on-line sledování výroby a má využití v procesní analytické technologii. Další využití je při zjišťování obsahu vody, velikosti částic, pevnosti tablet<sup>17</sup>, a k imagingu<sup>18, 19</sup>. Opět i v NIR spektrometrii lze využít transmisní měření i reflexní techniky (nejčastěji využívaná je difúzní reflexe – DRIFT)<sup>9, 10</sup>.

### 1.2.2. Ramanova spektrometrie

Ramanova spektrometrie (RS) je stejně jako IR spektrometrie vibračně spektrální metoda, jedná se o techniky komplementární. Uplatnění nalézá RS stejně jako IR spektrometrie v mnoha odvětvích průmyslu, včetně farmaceutického<sup>10, 12</sup>.

#### 1.2.2.1. Teorie Ramanovy spektrometrie

Vibrační módy jsou charakterizovány kvantovým číslem  $n$  ( $n = 0, 1, 2, 3, \dots$ ).

Přechody mezi jednotlivými stavy jsou spojeny se změnou energie, ta je kvantována

podle vztahu:  $E = h\nu \left( n + \frac{1}{2} \right)$

$\nu$  – frekvence vibračního přechodu

$h$  – Plankova konstanta

$E$  – Energie vibračního přechodu

$n$  – kvantové číslo

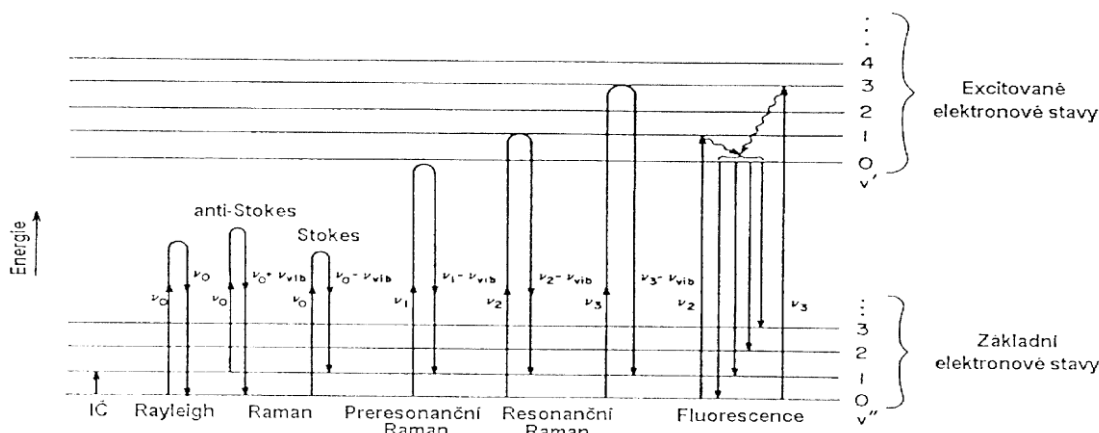
Pokud molekula absorbuje celé kvantum energie, dochází k přechodům sledovaným IR spektrometrií.

Druhou možností je, že k přechodům dochází během rozptylového efektu (absorpce fotonu a excitace molekuly do nevlastního energetického stavu s následnou emisí fotonu během relaxace molekuly na nižší energetický stav). Zatímco se v IR spektrometrii uplatňuje foton s energií daného vibračního přechodu, tak v RS dochází ke dvoufotonovému procesu (Energii vibračního přechodu odpovídá rozdíl mezi energiemi fotonu absorbovaného a emitovaného). Ke Stokesovu Ramanovu rozptylu



dochází při přechodu ze základní vibrační hladiny na hladinu vyšší, anti-Stokesův Ramanův rozptyl je pak obrácený případ<sup>10, 12, 20</sup>.

Jednotlivé typy přechodů jsou znázorněny na Obr. 5<sup>10</sup>



**Obr. 5:** Znázornění energetických přechodů po interakci záření s hmotou<sup>10</sup>

Módy s velkou změnou dipólového momentu, které mají v IR spektrech velmi intenzivní pásy, poskytují obvykle v RS málo intenzivní pásy a naopak. (Velice intenzivní pásy karboxylové a karboxylové skupiny v IR spektrech mají velice malou intenzitu v RS)<sup>10, 12</sup>

Hlavní výhodou RS je snadná příprava vzorku, malý vliv okolního prostředí (vlhkosti a oxidu uhličitého), možnost měřit v roztocích, vodných suspenzích, ve finálních obalech (sklo, polyethylen) a stejně jako v IR možnost připojení mikroskopu a využití k imagingu, mappingu<sup>10, 21, 22</sup>.

### 1.2.2.2. Instrumentace Ramanovy spektrometrie

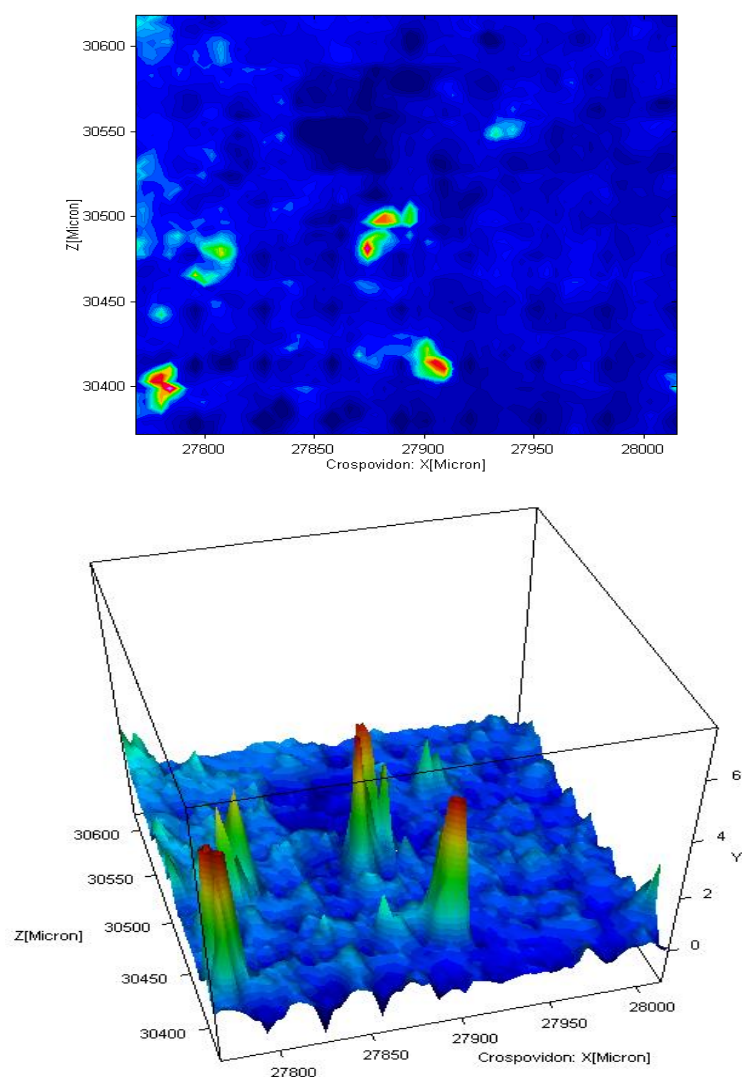
Základní prvky Ramanova spektrometru jsou stejné jako u IR spektrometru:

1. Zdroj záření (Obvykle laser, s vlnovou délkou od UV přes VIS až do NIR oblasti, u nižších vlnových délek je sice signál intenzivnější, ale je zde i riziko fluorescence – znehodnocení signálu).
2. Detektor (U interferometrických systémů jsou používány germaniové a křemíkové detektory a detektory ze sloučenin InGaAs, disperzní systémy využívají CCD – Charge Copule Device; snímač nábojovou vazbou.)
3. Interferometr / optické prvky (Interferometrické uspořádání - Fourierova transformace se používá u zdroje záření;  $\lambda = 1064 \text{ nm}$  (NIR)).

Mřížkové systémy jsou používány ve spektrometrech s budícími lasery vlnových délek UV a VIS a NIR – 785 nm)<sup>10, 12</sup>.

### 1.2.2.3. Použití Ramanovy spektrometrie ve farmacii

Aplikace RS je obdobná jako v IR s tím, že můžeme využít vzájemného rozdílu v intenzitách vibračních módů (můžeme elegantně identifikovat dvojně a aromatické vazby v molekule API vedle a bez rušivých vlivů substituovaných karbonylových a hydroxylových skupin excipientů (polysacharidy). Dále můžeme techniku použít k rozlišení polohové isomerie dvojně vazby a k rozlišení polymorfů. Nesmírnou výhodou je pak možnost měření ve vodných roztocích a přes transparentní obaly. Spojením s mikroskopem získáme cenné informace o distribuci a velikosti částic v lékových formách (mapping – Obr. 6)<sup>10, 12</sup>.



**Obr. 6:** Distribuce pomocné látky v řezu tablety (2D a 3D zobrazení)<sup>10</sup>

### 1.3. Vývoj přípravku v pevné fázi, polymorfismus

Látky jsou schopny v závislosti na různých krystalizačních podmínkách krystalizovat ve více krystalových strukturách neboli polymorfech (pokud je do struktury zahrnut i solvent, pak hovoříme o solvátech příp. solvatomorfech). O polymorfismus se nejedná, pokud substance v závislosti na rozpouštědle vytvoří krystaly různého tvaru (krystalová morfologie).

Polymorfismus API významně ovlivňuje její fyzikálně chemické vlastnosti (rozpuštnost, rychlost rozpouštění apod.)<sup>5</sup>.

Většina léčiv je podávána v pevné formě (tablety). Kromě molekulární struktury API jsou tedy pro formulaci finálního produktu (léčiva) důležité vlastnosti látky v pevné fázi. Většina farmaceuticky aktivních látek jsou slabé baze a kyseliny, v těchto případech je vhodné připravit tyto látky ve formě solí nebo kokrystalů<sup>23</sup>.

K polymorfním přechodům může dojít v průběhu výrobního procesu, např. při finální krystalizaci, sušení produktu, při homogenizaci, vlhké granulaci, při tabletování a v neposlední řadě i v lékové formě (tablety - vlivem excipientů, skladovacích podmínek, apod.)

Existuje několik způsobů, kterým je možné kontrolovat (alespoň částečně) polymorfní přechody<sup>5</sup>:

1. Výběrem nejstabilnějšího polymorfu (hydrátu, solvátu)

Pokud jsou totiž *polymorfy stabilní*, jsou sice hůře rozpustné, ale technologický postup jejich zpracování je robustní.

*Metastabilní polymorfy* jsou sice dobře rozpustné, ale mají kratší dobu expirace a vytvořit robustní technologii jejich přípravy je obtížné.

*Amorfní a semikrystlické fáze* jsou dobře rozpustné. (Jsou velmi oblíbené u generických výrobců).

2. Výběrem soli (kokrystalu) místo baze

Baze krystalizují ve více formách než jejich soli a kokrystaly.

3. Velmi přísnou technologickou kázní (správnou výrobní praxí - GMP)

4. Sterilní filtrací apod.

V rámci krystalizačního a polymorfního screeningu (zjišťování počtu polymorfů a polymorfních přechodů) je snahou nalézt nejlepší polymorfní modifikace, do níž pak API krystalizuje s požadovanými vlastnostmi. Přehled vlastností API, které jsou

závislé na typu polymorfní modifikace, a které pak ovlivňují odpovídající parametry v rámci formulace, jsou uvedeny v *Tab. 1*<sup>5, 25</sup>.

Jak již bylo naznačeno studování a monitorování polymorfní čistoty je velice důležité, z čehož plyne i zájem o tuto čistotu ze strany regulační autority.

Kromě fyzikálně chemických vlastností je formování různých modifikací solí a kokrytalů velice důležitým aspektem v rámci duševního vlastnictví, jelikož vyšší struktura pevné fáze může být patentově chráněna. Jak tomu také v mnoha případech je<sup>25</sup>. (např. patent polymorfní fáze clopidogrelu, US Patent 6504030<sup>24</sup>)

**Tab. 1**<sup>5</sup>: Vlastnosti API závislé na typu polymorfní modifikace a odpovídající parametry, které z těchto vlastností vychází.

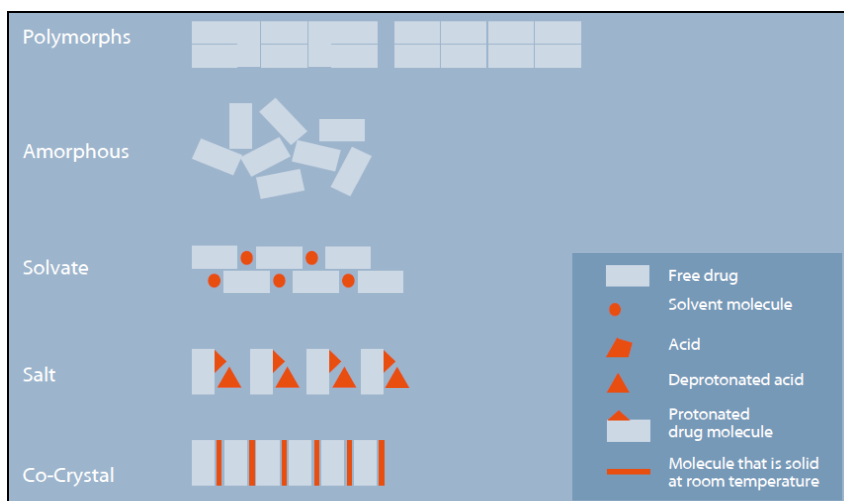
Vlastnost	→	Odpovídající parametr
Rozpustnost, disoluční profil	→	Farmakokinetický profil, biodostupnost
Velikost a tvar krystalu	→	Mletí, tablety, sypanost, filtrovatelnost
Chemická reaktivita	→	Stabilita vůči excipientům
Termální stabilita	→	Expirace
Hydrofobita	→	expirace
Hustota	→	Suspenzní formulace, lyofilizace
Tvrдость	→	Mletí
Barva	→	Léková formulace
Bod tání	→	Stabilita

### 1.3.1. Kokrystaly

Farmaceutické kokrystaly se skládají ze dvou a více složek, které jsou za pokojové teploty v pevném stavu. Na rozdíl od solí, u nichž může být proton přemístěn z kyselé nebo bazické funkce krystalizačního partnera, za předpokladu dostatečného rozdílu v  $pK_a$  mezi těmito partnery, tak u kokrytalů není žádná taková výměna možná. Na *Obr. 7* jsou pro vysvětlení schematicky znázorněny různé druhy pevných forem. Situace je ovšem mnohem složitější jelikož soli a kokrystaly mohou též tvořit solváty a projevat polymorfismus a stejně tak mohou být kokrystaly tvořeny ze solí a krystalizačních partner. Kokrystaly mají rozdílné vlastnosti (viz *Tab. 1*) od volné API a solí<sup>25</sup>.

V případě, že amorfní neutrální API netvoří soli, pak může být tvorba kokystalů snazší a elegantnější řešení.

Získávání API ve formě kokystalů může být východiskem jak obejít případný polymorfismus báze nebo kyseliny. V neposlední řadě poskytují kokristaly možnost dalšího patentového krytí<sup>5</sup>.



*Obr. 7:* Různé druhy pevných forem<sup>25</sup>

## 1.4. Farmaceutické pomocné látky

Léčivé přípravky obsahující pouze léčivé látky se ve farmaceutické praxi používají jen výjimečně. Ve většině případů je léčivý přípravek složen z léčivých i pomocných látek. Přičemž, pomocné látky pak významně ovlivňují jeho fyzikálně chemické vlastnosti, biologickou dostupnost, mají vliv na stabilitu a smyslové vjemy při jeho podání.

Pomocné látky (vehikula, excipienty, auxilianty) musí mít definované složení a nesmějí reagovat s ostatními léčivými nebo pomocnými látkami lékové formy, musí být tedy kompatibilní<sup>3</sup>.

Charakteristika některých významných pomocných látek používaných při formulaci pevných lékových forem je uvedena níže. (Zároveň se jedná látky, které byly použity pro formulaci přípravků analyzovaných v praktické části).

### 1.4.1. Celulóza, mikrokrystalická

Chemický název a CAS Nr. : celulóza [9004-34-6]

Popis: čištěná, částečně depolymerizovaná celulóza, jež se vyskytuje jako bílý krystalický prášek bez chuti a zápachu.

Je mnoho typů mikrokrystalické celulózy, vzájemně se liší velikostí částic (20 – 200 μm), stupněm depolymerizace, obsahem vlhkosti; většinou méně než 5 % (je hygroskopická) a dalšími fyzikálními vlastnostmi). Ve vodě je prakticky nerozpustná.

Použití: suspenzační činidlo, rozvolňovalo tablet, absorbent a plnivo do tablet a kapslí, ve výrobě tablet se používá se jak při vlhké granulaci tak pro přímé lisování.

Je inkompatibilní se silnými oxidačními činidly<sup>26</sup>.

### 1.4.2. Hydroxypropylcelulóza

Chemický název a CAS Nr.: 2-hydroxypropyl éter celulózy [9004-64-2]

Popis: Jedná se o částečně substituovaný poly(hydroxypropyl) éter celulózy. Komerčně je dostupná v různé kvalitě, jednotlivé druhy mají pak rozdílnou viskozitu roztoku, molekulová hmotnost je pak v rozmezí 50000 – 1250000. Jedná se o bílý až slabě žlutý prášek bez chuti a zápachu.

Je dobře rozpustná ve vodě o teplotě 38°C za tvorby čirých koloidních roztoků, v horké vodě je nerozpustná. Je hygroskopická, obsah vody se liší (4 - 12 %).

Použití: suspenzační činidlo, stabilizační, emulzifikační a obalovací činidlo, pojivo a viskozofiant. Při výrobě tablet se primárně používá jako pojivo, obalovací film a k výrobě forem s prodlouženým uvolňováním. Málo substituovaná HPC se používá jako desintegrant.

Roztoky HPC jsou inkompatibilní se substituovanými deriváty fenolu (parabeny).

Přítomnost anionaktivního polymeru může zvýšit viskozitu roztoku.

Kompatibilita s anorganickými soli závisí na druhu soli a její koncentraci<sup>26</sup>.

### 1.4.3. Laktóza

Chemický název a CAS Nr.:

O-β-D-Galactopyranosyl-(1→4)-α-D-glukopyranosa anhydrát [63-42-3]

O-β-D-Galactopyranosyl-(1→4)-α-D-glukopyranosa monohydrát [64044-51-5]

Popis: bílé krystalické částičky nebo prášek, jemně sladké chuti bez zápachu

Anhydrát laktózy obsahuje do 1% vody, zatímco monohydrát 4,5 – 5,5 %

Použití: Plnivo pro práškové inhalátory a pro tablety a kapsle.

Komerčně je dostupná laktóza rozdílné jakosti, tyto se pak liší svými fyzikálními vlastnostmi jako jsou velikost částic a tokové vlastnosti.

Inkompatibility laktózy (především amorfni formy) se objevují se sloučeninami s primární aminovou skupinou (s aminokyselinami, amfetaminy a dalšími).

Použití laktózy u pacientů s deficitem střevního enzymu laktázy je omezené<sup>26</sup>.

#### **1.4.4. Meglumin**

Chemický název a CAS Nr.: 1-deoxy-1-(methylamino)-D-glucitol [6284-40-8]

Popis: bílý až jemně žlutý krystalický prášek, jedná se o organickou bazi.

Použití: Jako činidlo upravující pH a solubilizační činidlo.

Inkompatibility vykazuje s hliníkem, mědí, minerálními kyselinami, oxidačními činidly<sup>26</sup>.

#### **1.4.5. Sorbitol**

Chemický název a CAS Nr.: D- Glucitol [50-70-4]

Popis: Jedná se o hexahydroxy alkohol příbuzný manóze, isomerní s manitolem. Je to bílý hygroskopický krystalický prášek, příjemné sladké chuti vyvolávající chladivý pocit.

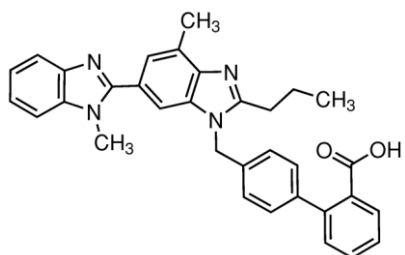
Použití: jako humektant, plastifikátor, chuťové korigens (žvýkáci tablety), plnivo tablet a kapslí (používá se jak při vlhké granulaci, tak při přímém lisování). V tekutých lékových formách se používá jako vehikulum místo sacharózy/fruktózy.

Inkompatibility jsou pozorovány v neutrálních vodných roztocích penicilinů, kde urychluje jejich degradaci. Sorbitol také reaguje s oxidy železa<sup>26</sup>.

## 1.5. Účinné látky

Farmakologické, toxikologické a klinické údaje, včetně možných interakcí dvou účinných látek, které jsou obsaženy v analyzovaných přípravcích, jsou uvedeny níže.

### 1.5.1. Telmisartan



CAS No.: 144701-48-4

Synonyma: BIBR 277, 4'[(1,4'-Dimethyl-2'-propyl[2,6'-bi-1H-benzimidazol]-1'-yl)methyl][1,1'-biphenyl]-2-carboxylic acid

Strukturní vzorec: C<sub>33</sub>H<sub>30</sub>N<sub>4</sub>O<sub>2</sub>

Molekulová hmotnost: 514.6<sup>27</sup>

Telmisartan patří do skupiny specifických inhibitorů na AT<sub>1</sub>-receptoru (receptoru pro angiotensin II)<sup>28</sup>.

Tato látka tedy stejně jako ACE inhibitory interaguje s renin-angiotensin-aldosteronovým systémem (RAA), neovlivňuje však dekompozici bradykininu, a proto také nevyvolává suchý kašel. Indikací tedy je hypertenze a insuficience myokardu<sup>28</sup>.

Na Obr. 8 je znázorněn RAA a možnosti jeho ovlivnění.

Obvyklá účinná dávka je 40 mg jednou denně, nicméně lze ji zvýšit až na 80 mg jednou denně. Po prvním podání dojde do tří hodin k redukci krevního tlaku, maximálního účinku se dosáhne v průběhu 4 – 8 týdnů<sup>29</sup>.

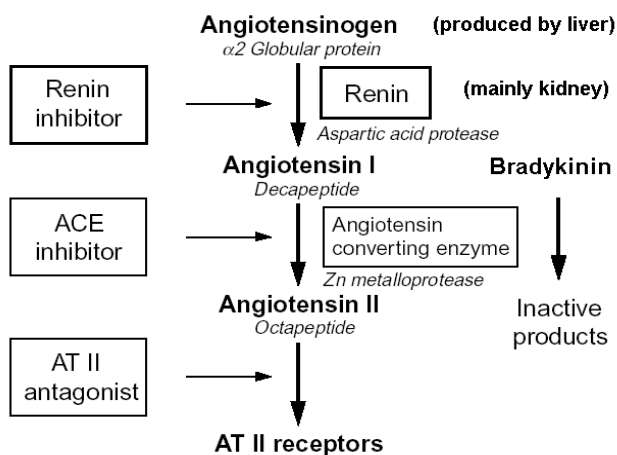
U pacientů, jejichž cévní tonus a renální funkce závisejí převážně na aktivitě RAA (pacienti se závažným selháním srdce, nebo po předchozí terapii diuretiky) může být léčba telmisartanem spojena s akutní hypotenzí, oligurií nebo s akutním selháním ledvin. Podávání telmisrtanu (stejně jako ostatních léčiv ovlivňující RAA) může vést k hyperkalémii, jež může být u predisponovaných jedinců (diabetici, pacienti s poškozenými ledvinami, starší pacienti) až fatální. Proto se obzvláště u těchto pacientů doporučuje hladinu draslíku v séru pečlivě monitorovat<sup>28, 29</sup>.



Riziko hyperklémie je také třeba vzít v úvahu v případě léčby dalšími léky, které sérovou hladinu kalia zvyšují, a to: Kalium šetřící diuretika, ACE inhibitory, NSA, náhražky soli obsahující draslík, heparin, imunosupresiva, trimethoprim<sup>28, 29</sup>.

Kontraindikací je druhý a třetí trimestr, obstrukce žlučovýchodů, závažné poškození jater. Použití telmisartanu musí být velice obezřetné v případech, kdy pacient trpí oboustrannou stenózou renálních arterií, u pacientů s renálním poškozením. Pacienti s primárním aldosterinismem (např. tumor kůry nadledvin se zvýšenou produkcí aldosteronu) na léčbu telmisratanem nereagují<sup>28, 29</sup>.

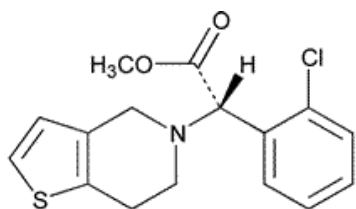
Originálním přípravkem s obsahem telmisartanu je přípravek Micardis (výrobce Boehringer Ingelheim International GmbH)<sup>29</sup>.



**Obr. 8<sup>30</sup>** Schematické znázornění RAA a jeho možné ovlivnění farmaky. *AT II* antagonist je specifický antagonist na  $AT_1$ -receptoru (receptoru pro angiotensin II).

## 1.5.2. Clopidogrel

### Clopidogrel hydrogensulfát



CAS No.: 135046-48-9

Synonyma: SR-25990, Methyl (2-chlorophenyl)(6,7-dihydro-4H-thieno[3,2-c]pyridin-5-yl)acetate hydrogen sulfate

Molekulový vzorec:  $C_{16}H_{16}ClNO_6S \cdot H_2SO_4$

Molekulová hmotnost: 419,9<sup>31, 32</sup>

Clopidogrel patří mezi inhibitory agregace trombocytů. Jeho účinek spočívá v selektivní inhibici vazby adenosin difosfátu (ADP) na jeho destičkový receptor, čímž brání ADP-zprostředkované aktivaci komplexu GPIIb/IIIa, dochází tak k inhibici agregace trombocytů. Zabraňuje navázání kontaktu mezi fibrinogenem a glykoproteinovými (GP) molekulami na povrchu trombocytů<sup>28, 33</sup>.

Samotný clopidogrel je prekurzor léku. Aktivní metabolit, thiolový derivát, vzniká oxidací clopidogrelu na 2-oxo-clopidogrel a další hydrolyzou<sup>28, 33</sup>.

Modifikace ADP receptoru na povrchu trombocytů je ireverzibilní, obnovení normálních destičkových funkcí je vázáno na rychlost obnovy jejich populace.

Opakované dávky 75 mg denně vyvolají podstatnou inhibici ADP-indukované agregace trombocytů již od prvního dne; tato inhibice dosahuje rovnovážného stavu mezi 3. a 7. dnem podávání. Agregace destiček a doba krvácivosti se obvykle vrátí k původním hodnotám během 5 dnů po ukončení terapie<sup>28, 33</sup>.

Clopidogrel je indikován k prevenci aterotrombotických příhod u dospělých pacientů po infarktu myokardu (prodělaném méně než před 35-ti dny), po ischemické cévní mozkové příhodě (prodělané méně než před 6-ti měsíci) nebo s prokázanou ischemickou chorobou dolních končetin. Dále pak u pacientů s akutním koronárním syndromem, včetně pacientů, kteří podstupují implantaci stentu, v kombinaci s kyselinou acetylsalicylovou (ASA)<sup>33</sup>.

Kontraindikací bývá závažná porucha funkce jater a aktivní patologické krvácení jako krvácení při peptickém vředu nebo intrakraniální hemoragie<sup>28, 33</sup>.

Stejně jako u ostatních antiagregancií by clopidogrel měl být užíván s opatrností u pacientů s možným rizikem zvýšeného krvácení po traumatu, operaci nebo v důsledku jiných patologických stavů a v případě současného podání clopidogrelu a ASA, heparinu, inhibitorů GP IIb/IIIa (abciximab, tirofiban) nebo NSAID včetně COX-2 inhibitorů<sup>33</sup>.

Analogní, ovšem starší látkou je tiklopidin. Originálním přípravkem s obsahem clopidogrelu je přípravek Plavix (výrobce Sanofi Pharma Bristol-Myers Squib SNC)<sup>33</sup>.

## **2. CÍL PRÁCE**

Cílem práce bylo studium případných interakcí a inkompatibilit mezi účinnou látkou (API) a látkami pomocnými (excipienty) a veškerých případných kvalitativních změn účinné látky u dvou léčivých přípravků (tabletech určených k hromadné výrobě) s obsahem clopidogrelu a telmisartanu pomocí:

- I.** Infračervené spektrometrie (FT-IR ATR technikou a transmisním měřením)
- II.** Ramanovy spektrometrie

### **3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST**

#### **3.1. Seznam instrumentace, chemikálií a farmaceutických substancí**

##### **Seznam instrumentace a pomůcek**

FT-Ramanův spektrometr RFS 100/S, Bruker Optics, SRN;  $\lambda = 1064$  nm

IR spektrometr Nicolet NEXUS Thermo elektron corporation, USA

Lis; Trystom Olomouc H62

Váhy; Denver Instrument, USA

Ocelová špachtlička

Třenka

Skleněné vialky (2,0 ml)

##### **Seznam chemikálií a farmaceutických substancí**

Pomocné látky

Clopidogrel hydrogensulfát (Zentiva)

Telmisartan, telmisrtan sodná sůl (Zentiva)

KBr; Fischer Scientific, CAS 7758-02-3, IR grade, 99+% ( $M_w = 119$ )

## Složení přípravku (Tbl.) s obsahem API: Clopidogrel a Telmisartan

### Tbl. s obsahem clopidogrelu 100 mg

Složka
Clopidogrel hydrogensulfát (API)
Laktóza anhydrát
Mikrokrystalická celulóza
Hydroxypropylcelulóza
Hydrogenovaný ricinový olej
Talek
Aerosil

### Tbl. s obsahem telmisartanu 80 mg

Složka
Telmisartan sodná sůl (API)
Meglumin
Povidon 25
Sorbitol
Magnesium stearát

Pozn.: V tabulce jsou uvedeny pouze excipienty, jež jsou v dané formulaci majoritní.

Pokud je Tbl. obalená, excipienty nacházející se v obalu nejsou uvedeny, protože tablety byly před případnou úpravou vzorku a analýzou potahu zbaveny. Rovněž chybí údaje o kvantitativním zastoupení jednotlivých složek Tbl., zmiňované bylo vynecháno s ohledem na výrobní tajemství společnosti Zentiva.

## 3.2. Nastavení instrumentů, příprava vzorků

### 3.2.1. IR instrumentace a příprava vzorků

#### IR spektrometr

Pro měření IR spekter byl použit IR spektrometr, pro reflexní měření by tento přístroj opatřen ATR nástavcem (krystal ZnSe).

(Vždy bylo nejprve změřeno pozadí; background)

Parametry měření pro každý vzorek byly následující:

Rozlišení: 2,000  $\text{cm}^{-1}$

Počet scanů: 64

Zero fillinig: 0

Apodizace: Happ-Genzel

#### Příprava vzorků a způsob měření

##### A) Transmisní měření

Pro zjištění/studium případných interakcí popř. inkompatibilit ve formulovaných přípravcích pomocí techniky *transmisního měření* byly změřeny vzorky API, jednotlivých excipientů a výsledné formulované tablety, vzorky byly rozetřeny s vysoce čistým a suchým KBr, vše bylo pečlivě promícháno pomocí speciálního mlýnu a silou 60 kN byla vylisována tableta. Její transmise byla následně změřena, aby se však eliminoval vliv vzdušné vlhkosti a  $\text{CO}_2$ , bylo nejprve provedeno měření pozadí.

Měření byla provedena dvakrát.

Jednotlivé navážky API, jednotlivých excipientů a výsledné formulované tablety pro přípravek s obsahem Clopidogrelu jsou uvedeny v *Tab. 2*, navážky pro přípravek s obsahem Telmisartanu jsou uvedeny v *Tab. 3*, v tabulkách je též uvedena výsledná hmotnost (Tbl./g) a tloušťka v milimetrech (Tbl./mm) vylisované KBr tablety.

**Tab. 2 – Navážky pro transmisní měření; přípravek s obsahem clopidogrelu**

	Číslo měření	navážka/g	KBr	Tbl./hm	Tbl./mm
API Clopidogrel hydrogensulfát	1	0,00065	0,24603	0,23464	0,81
	2	0,00073	0,23773	0,21665	0,81
Laktóza anhydrát	1	0,00061	0,25515	0,20387	0,73
	2	0,00074	0,24367	0,21764	0,74
Mikrokrystalická celulóza	1	0,00061	0,24357	0,23658	0,75
	2	0,00072	0,2384	0,22849	0,73
Hydroxypropylcelulóza	1	0,0006	0,24519	0,23205	0,8
	2	0,00077	0,25842	0,25053	0,81
Ricinový olej hydrogen.	1	0,00061	0,24991	0,24733	0,76
	2	0,00071	0,24854	0,24005	0,75
Talek	1	0,00065	0,23325	0,22336	0,7
	2	0,00068	0,23897	0,22986	0,72
Aerosil	1	0,00059	0,25463	0,24352	0,79
	2	0,00067	0,23984	0,22764	0,76
Clopidogrel Tbl.	1	0,00067	0,25818	0,24126	0,86
	2	0,00053	0,23906	0,22151	0,79

**Tab. 3 – Navážky pro transmisní měření; přípravek s obsahem telmisartanu**

	Číslo měření	navážka/g	KBr/g	Tbl./g	Tbl./mm
API Telmisartan sodná sůl	1	0,00065	0,25814	0,25297	0,82
	2	0,00092	0,24648	0,22509	0,84
Meglumin	1	0,00072	0,23419	0,22786	0,75
	2	0,00074	0,2331	0,22632	0,74
Povidon 25	1	0,00087	0,24119	0,23129	0,83
	2	0,00075	0,24982	0,24157	0,81
Sorbitol	1	0,00072	0,25918	0,23017	0,86
	2	0,00075	0,24674	0,23007	0,85
Magnesium stearat	1	0,00086	0,25053	0,22333	0,73
	2	0,00078	0,24765	0,23092	0,72
Telmisartan Tbl.	1	0,00071	0,26415	0,25722	0,8
	2	0,00073	0,25711	0,24817	0,8



## B) Reflexní měření

Pro zjištění/studium případných interakcí popř. inkompatibilit a změn kvality API ve formulovaných přípravcích bylo provedeno *reflexním měřením*, pomocí techniky FT-IR ATR. Pro konkrétní přípravek bylo vždy změřeno: API samotná, API s každým excipientem zvlášť a výsledná formulovaná (rozetřená) tableta. Vzorky na jednotlivá měření byly podrobeny lisovací síle 80 kN, tento výlisek byl následně rozetřen na prach a změřen. Tlak na vzorky je vyvíjen za účelem studie případných polymorfních přechodů nebo jiných změn ve kvalitě API, ke kterým by mohlo dojít během formulace.

Deset mg vzorku bylo odebráno na špičku ocelové špachtličky a umístěno na ZnSe krystal. Poté byl vzorek adekvátně ke krystalu přitlačen. Kromě vlastního měření, bylo jako v předchozím případě měřeno také pozadí (background).

Jednotlivá měření byla provedena pro vzorky připravené dle schématu v *Tab. 4*, pro každý případ dvakrát. Jednotlivé kvantitativní poměry API a excipientů jsou v poměru 1:1, nebo v případě nadbytečného množství konkrétního excipientu ve výsledném přípravku, je použit adekvátní přebytek excipientu.

Konkrétní kvantitativní údaje těchto směsí, opět nejsou uvedeny ohledem na výrobní tajemství.

**Tab. 4: Pomocí reflexní techniky bylo provedeno měření těchto vzorků**

### Přípravek s obsahem Clopidogrelu

- API (Clopidogrel hydrogensulfát)
- Tbl.
- API + Laktóza anhydrát
- API + Mikrokrystalická celulóza
- API + Hydroxypropylcelulóza
- API + Ricinový olej hydrogen.

### Přípravek s obsahem Telmisartanu

- API (Telmisartan)
- Tbl.
- API + Meglumin
- API + Sorbitol
- API + Povidon 25
- API + Magnesium stearát

### **3.2.2. Instrumentace Ramanova spektrometru a příprava vzorků**

#### **Ramanův spektrometr**

Pro měření Ramanových spekter byl použit Ramanův spektrometr. Parametry měření pro každý vzorek byly následující:

Rozlišení: 2,000  $\text{cm}^{-1}$

Počet scanů: 256

Zero fillinig: 4

Apodizace: Happ-Genzel

#### **Příprava vzorků a způsob měření**

Pro studium případných interakcí/ inkompatibilit ve formulovaných přípravcích pomocí Ramanovy spektrometrie byly použity vzorky připravené naprosto identickým způsobem jako pro měření pomocí FT-IR ATR techniky, odpovídá *Tab. 4*. Měření vzorků se provádělo ve skleněných vialkách.

## 4. VÝSLEDKY A DISKUZE

### 4.1 IR spektra

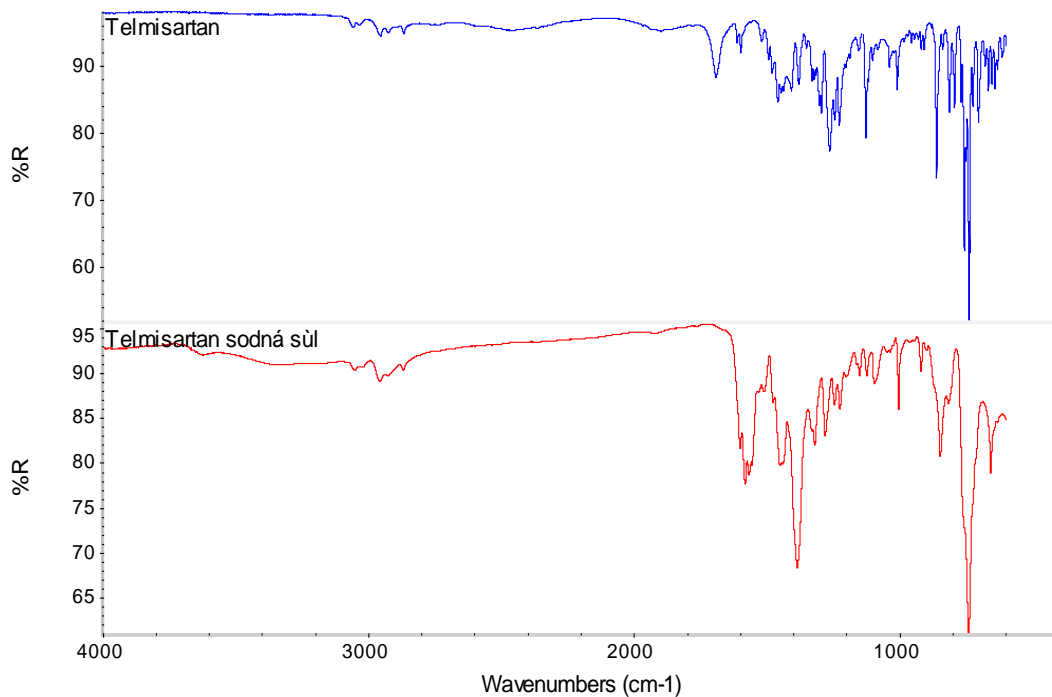
#### 4.1.1 Spektra účinných látek; telmisartan a clopidogrel

Přípravek s obsahem telmisartanu obsahuje API ve formě sodné soli. Pro porovnání rozdílů ve spektru API telmisartanu volné kyseliny a telmisartanu sodné soli jsou zde uvedeny *Obr. 9 a 10*. Vzorky byly měřeny FT-IR ATR technikou. Zároveň by se tímto způsobem od sebe daly odlišit i různé typy solí, především jedno od dvojmocných.

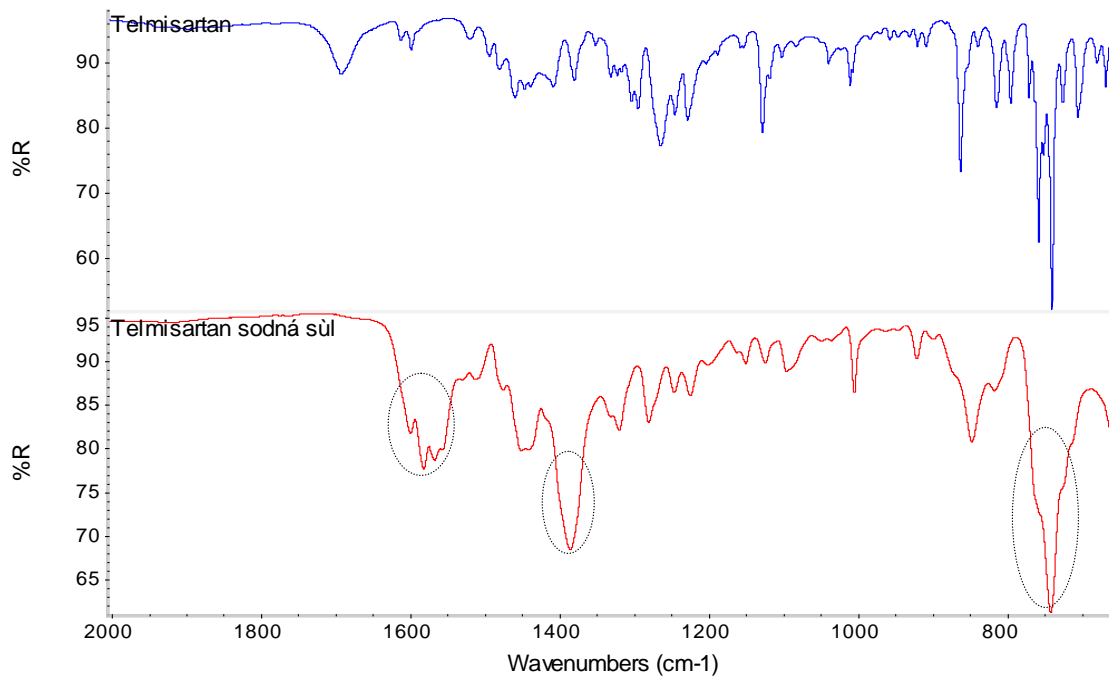
Spektra na *Obr. 9* jsou zobrazena v celém měřeném rozsahu ( $4000 - 500 \text{ cm}^{-1}$ ). Pro další vyhodnocování, především studie případných interakcí, bude využit výřez oblasti ( $2000 - 500 \text{ cm}^{-1}$ ), oblasti otisků prstů. V této oblasti lze předpokládat nejvýraznější změny ve spektrech v případě interakcí.

Ve spektrech na *Obr. 11, 12 a 13* bylo provedeno přiřazení základních charakteristických pásů pro obě API (Pro srovnání je jednou demonstrováno spektrum pořízeno reflexní a v druhém případě transmisní technikou).

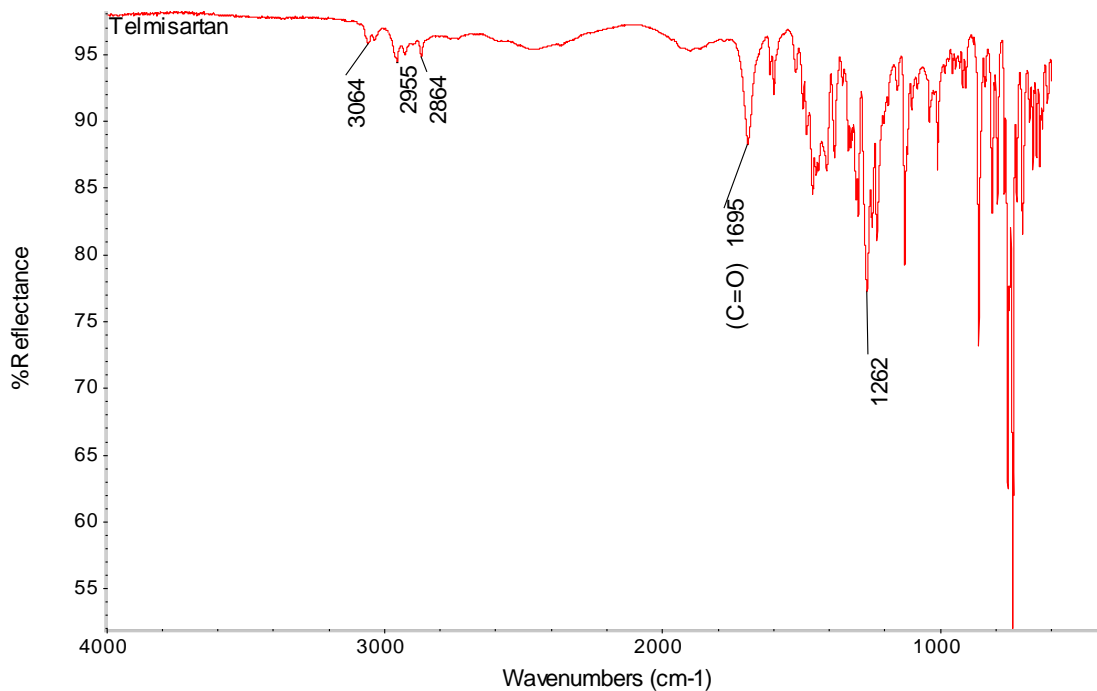
Přiřazení základních pásů je u API telmisartan na *Obr. 11 a 12* (Spektra byla pořízena FT-IR ATR technikou). Ve spektru na *Obr. 13* je pak přiřazení základních pásů pro API clopidogrel hydrogensulfát. (Toto spektrum bylo pořízeno FT-IR transmisní technikou). Pokud by ovšem měla být provedena jednoznačná identifikace, tak v rámci farmaceutických analýz se nejčastěji využívá metoda srovnání spekter analyzovaných látek s referenčními spektry nebo se spektry standardů analyzovaných látek. Abychom však eliminovali vliv polymorfních přechodů, museli bychom vzorek k identifikaci i vzorek standardu rozpustit a nechat vykristalizovat za stejných podmínek.



**Obr. 9:** Spektra API telmisartanu volné kyseliny (modré spektrum) a jeho sodné soli (červené spektrum); rozsah: (4000 – 500 cm<sup>-1</sup>)



**Obr. 10:** Spektra API telmisartanu volné kyseliny (modré spektrum) a jeho sodné soli (červené spektrum); rozsah: (2000 – 630 cm<sup>-1</sup>)

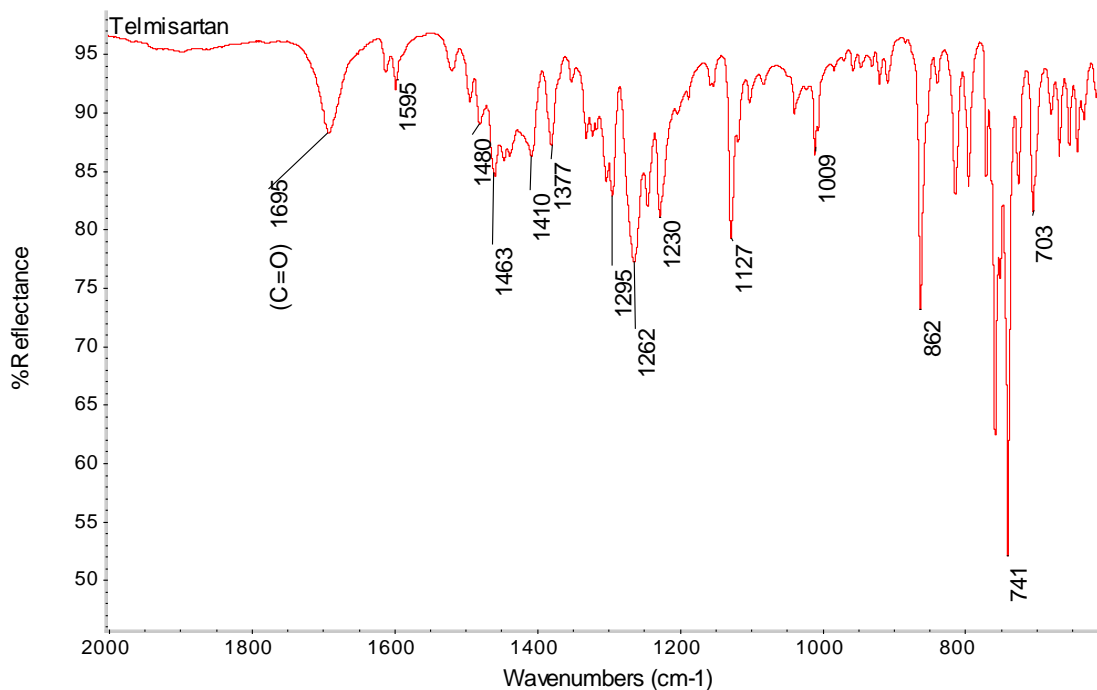


**Obr. 11:** Spektrum API telmisartanu, pořízené technikou ATR (reflexe).

Měřený rozsah: 4000 cm<sup>-1</sup> – 630 cm<sup>-1</sup>

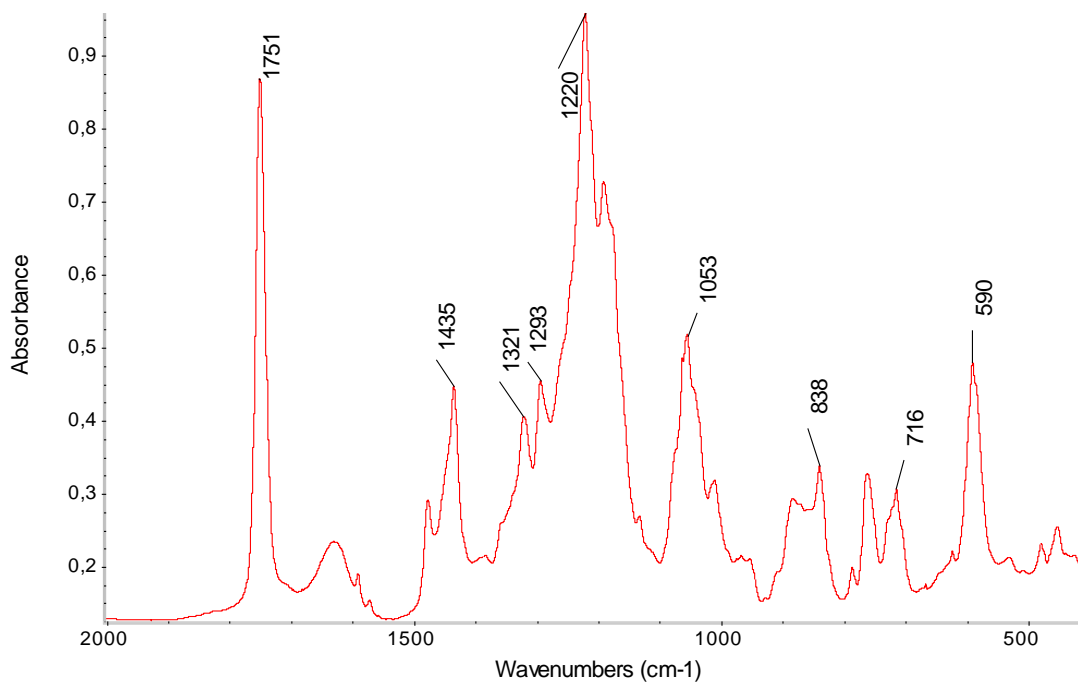
Hodnoty vlnočtů jednotlivých charakteristických pásů jsou následující:

$\nu(\text{C-H})$  3064, 2955, 2864;  $\nu(\text{C=O})$  1695,  $\nu(\text{C=C}) + \nu(\text{C=N})$  1595, 1480, 1463, 1410, 1377;  $\nu(\text{COO})$  1262, 1230 cm<sup>-1</sup>



**Obr. 12:** Jedná se též o spektrum API telmisartanu, jako v případě Obr 11.

Je zde ovšem zobrazen výřez spektra: 2000 cm<sup>-1</sup> – 600 cm<sup>-1</sup>



**Obr. 13:** Spektrum **API Clopidogrelu hydrogensulfátu**, pořízené transmisním měřením (**v KBr**).

Hodnoty vlnočtů jednotlivých charakteristických pásů jsou následující:

$\nu(\text{C}=\text{O})$  1751, 1220;  $\nu(\text{C}-\text{H})$  1435;  $\nu$  (aromatická C-H) 830 – 650

#### **4.1.2 Studium případných kvalitativních změn API ve formulovaných přípravcích pomocí FT – IR transmisním měřením**

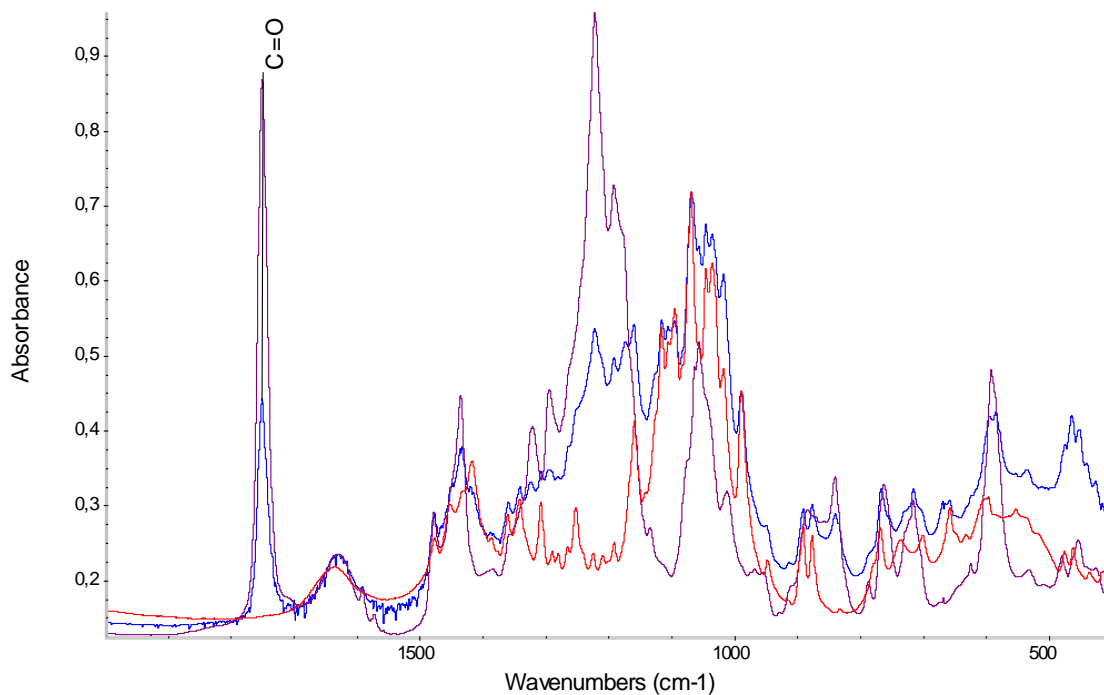
Výsledky studia případných kvalitativních změn API ve formulovaných přípravcích pomocí FT – IR transmisním měřením jsou v práci zaznamenány ve spektrech na *Obr. 14 – 17*. Byla provedena všechna měření na základě *Tab. 2 a 3*. Zde prezentované jsou však pouze výsledky ve spektrech na *Obr. 14 a 15* pro přípravek s obsahem clopidogrelu a na *Obr. 16 a 17* pro přípravek s obsahem telmisartanu.

Jak je patrné z *Obr. 14 a 15*, nejvíce zastoupeným excipientem v přípravku s obsahem clopidogrelu je laktóza, její absorpční pásy se nejvíce podílejí na spektru dané lékové formy (krom pásů API).

Na *Obr. 16 a 17* je patrné, že nejvíce zastoupeným excipientem v přípravku s obsahem telmisartanu, je sorbitol. Jeho absorpční pásy se nejvíce podílejí na výsledném spektru dané lékové formy (krom pásů API).

Na spektrech lékových forem se podílejí pouze pásy excipientů a molekul API. Nedochozí ke změnám ve spektrech lékových oproti prostému součtu spekter jednotlivých složek. Obě API jsou na základě těchto měření ve svých lékových formách nezměněné, tedy v původní kvalitě.

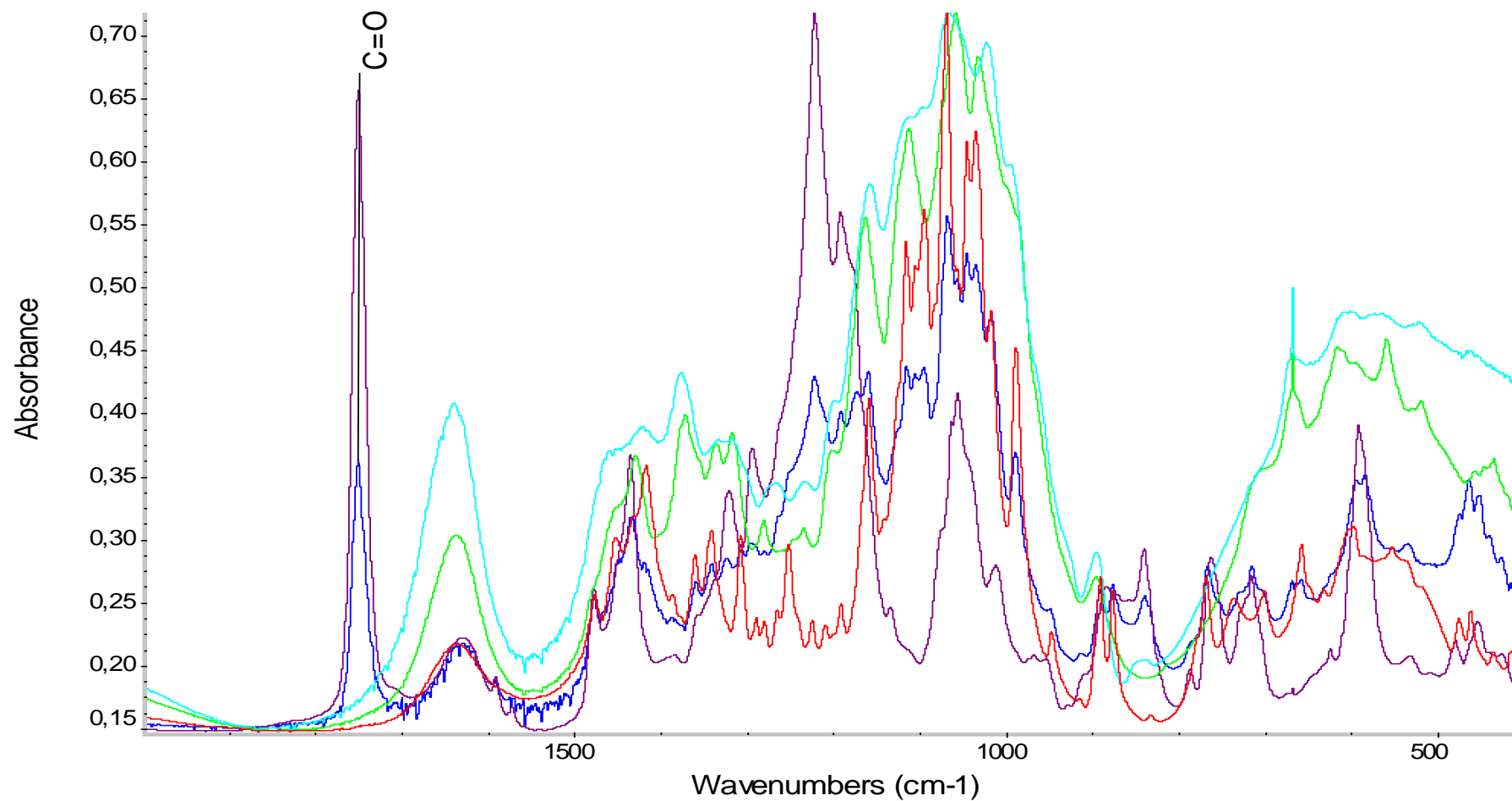
#### 4.1.2.1. Přípravek s obsahem clopidogrelu



**Obr. 14:** Spektra: Léková forma (Tbl); **modrá**  
API (Clopidogrelu hydrogensulfátu); **fialová**  
Laktóza anhydrát.; **červená**

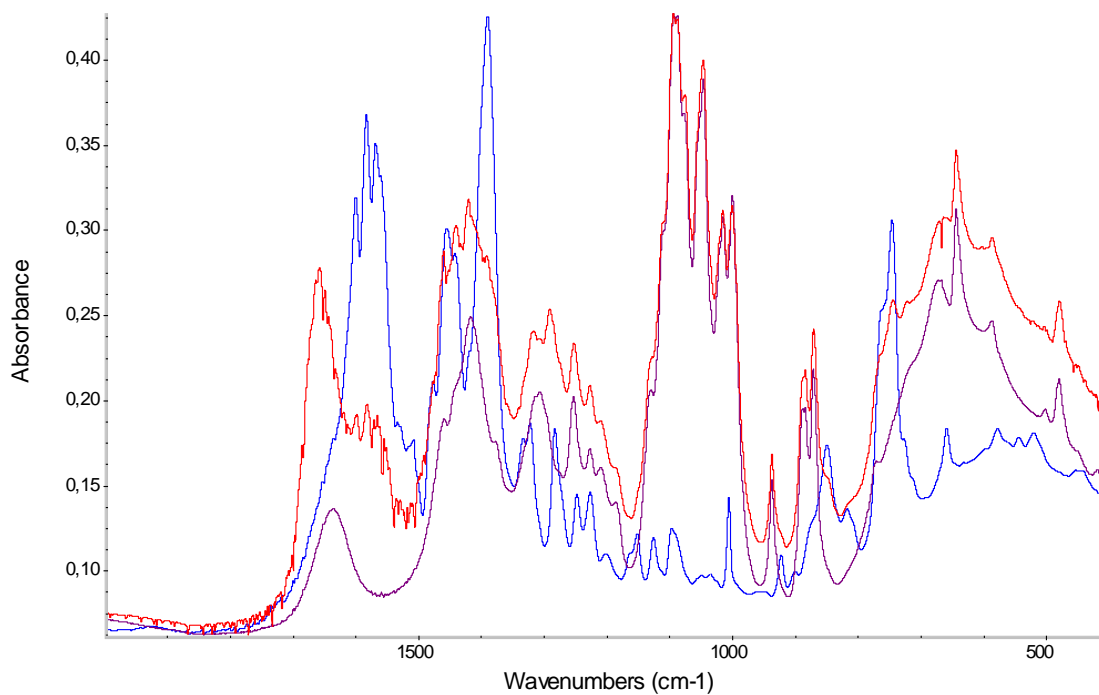
Spektra dalších excipientů jsou uvedeny na *Obr. 15*, doplněny jsou spektra celulóзовých derivátů. Ostatní excipienty jsou v přípravku v minoritním množství, výsledné spektrum lékové formy významně neovlivňují, a tedy nejsou pro přehlednost znázorněny.





**Obr. 15:** Spektra: Léková forma (Tbl); **modrá** Mikrokrytalická celulóza; **zelená**  
 API (Clopidogrelu hydrogensulfátu); **fialová** Hydroxypropylcelulóza; **tyrkysová**  
 Laktóza anhydrát.; **červená**

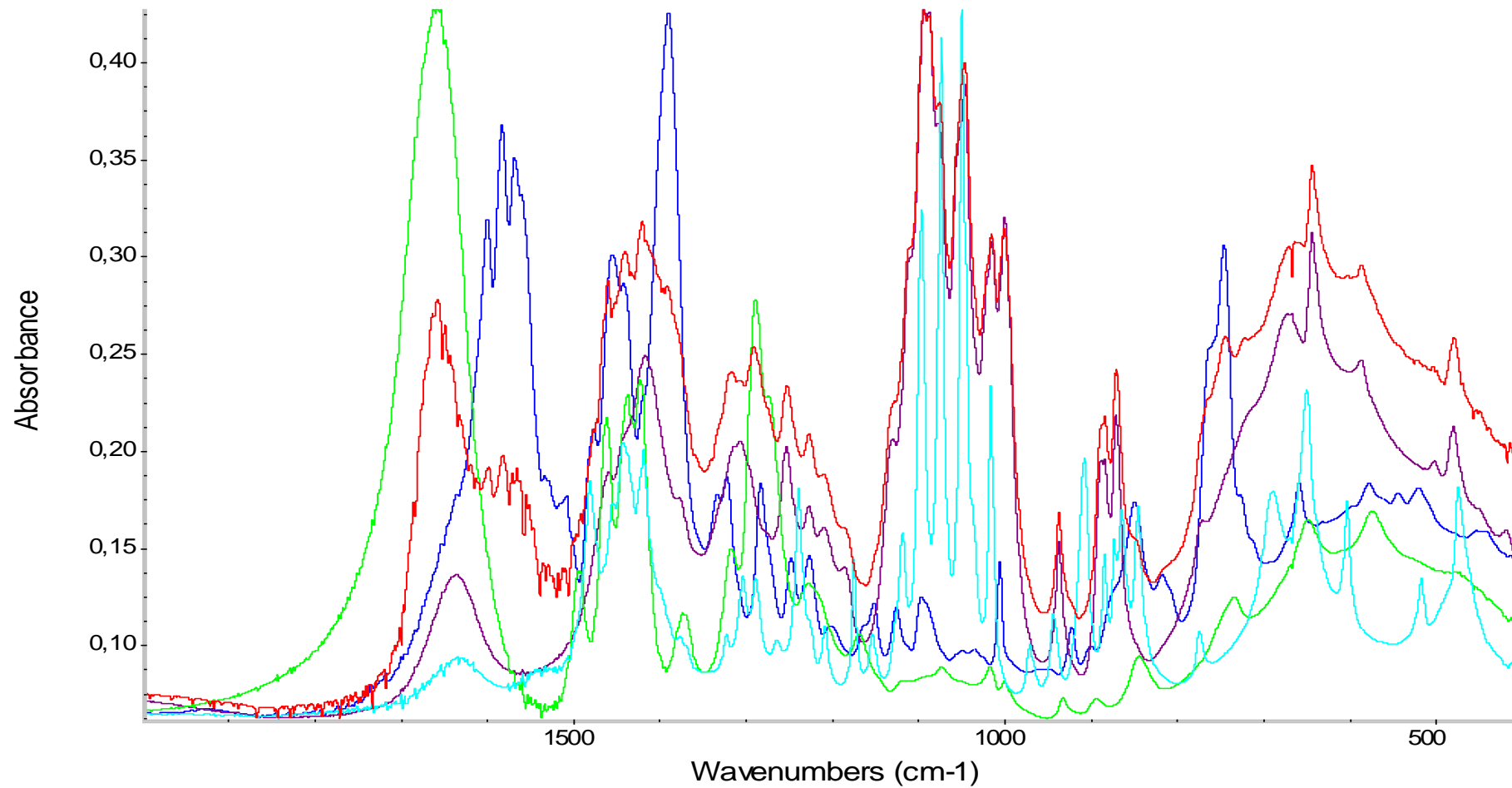
#### 4.1.2.2. Přípravek s obsahem telmisartanu



**Obr. 16:** Spektra: Léková forma (Tbl); **červená**  
API (Telmisartan sodná sůl); **modrá**  
Sorbitol; **fialová**

Spektra dalších excipientů v lékové formě jsou uvedeny na *Obr. 17*.

I v tomto případě nejsou ostatní excipienty, které výsledné spektrum lékové formy neovlivňují (v přípravku jsou v minoritním množství), pro přehlednost znázorněny.



*Obr. 17:* Spektra: Léková forma (Tbl); **červená**

API (Telmisartan sodná sůl); **modrá**

Sorbitol; **fialová**

Meglumin; **tyrkysová**

Povidon 25; **zelená**

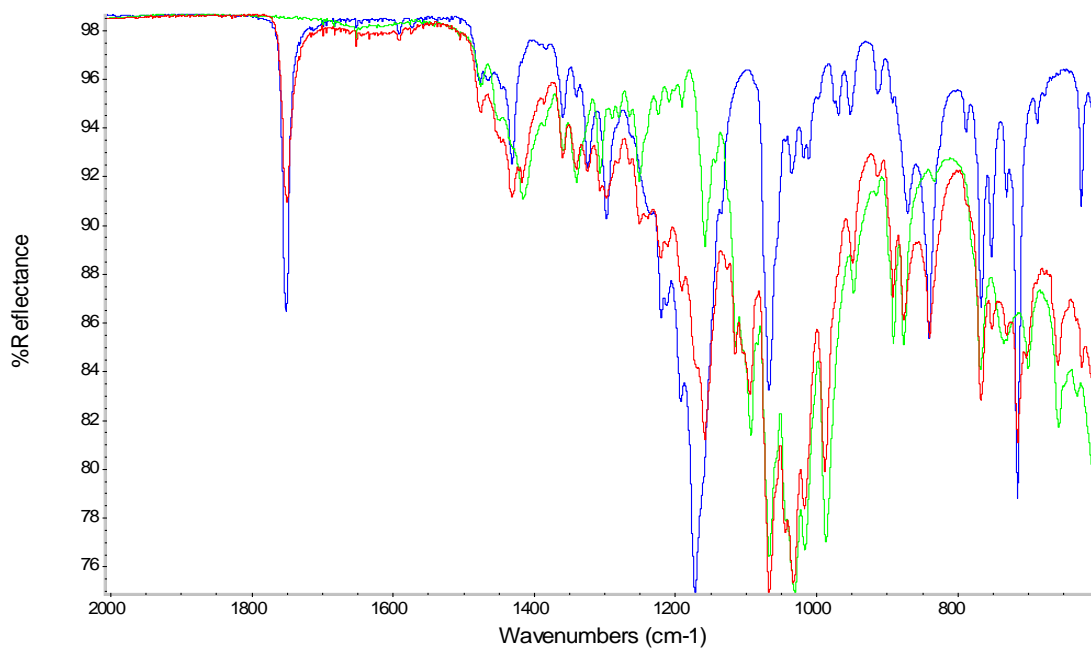
### **4.1.3 Studium případných kvalitativních změn API ve formulovaných přípravcích pomocí FT-IR ATR**

Pro zjištění případných změn v kvalitě API (interakcí popř. inkompatibilit) na základě vlivu použitých excipientů byla provedena měření vzorků připravených podle schématu v *Tab. 4*. Měření byla provedena FT-IR ATR technikou. V této sekci - výsledky jsou zaznamenána spektra pouze od nejvýznamnějších excipientů, a to pro přípravek s obsahem clopidogrelu – spektra na *Obr. 18 a 19* a pro přípravek s obsahem telmisartanu spektra na *Obr. 20 a 21*.

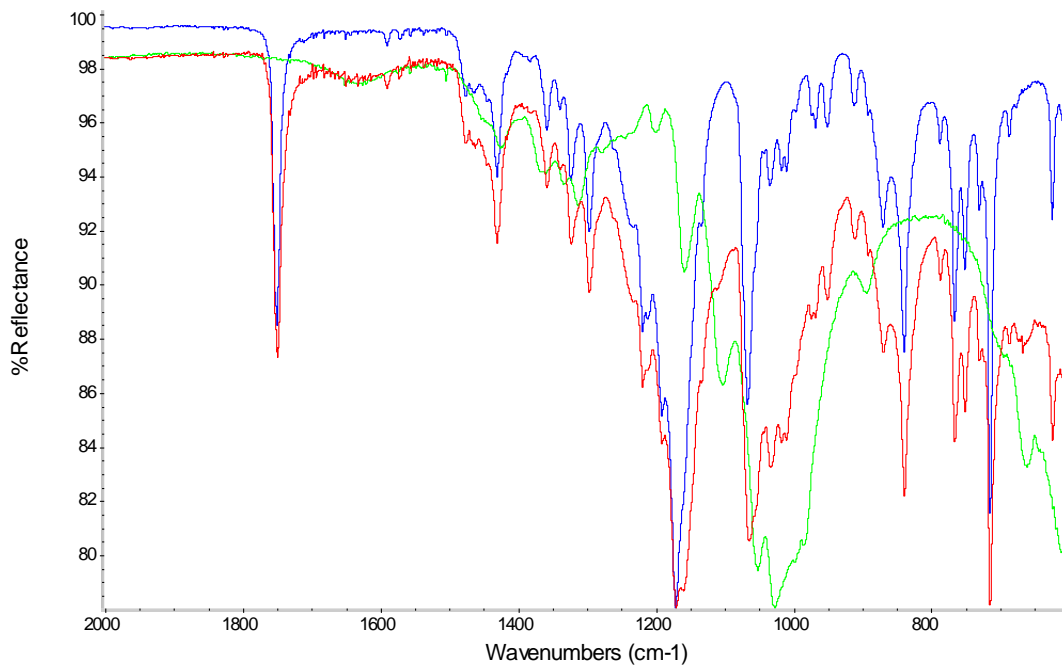
Jednotlivé vzorky (API + excipient) byly podrobeny lisovacímu tlaku o síle 80 kN a následně rozetřeny v třence.

Jak je vidět na *Obr. 18 – 21*, nedochází ke změnám ve spektru směsi oproti prostému součtu spekter jednotlivých složek. Nevznikají nové pásy, nedochází k jejich posunům nebo vymizení. Nejsou pozorovány změny, které by byly zapříčiněny nežádoucími interakcemi mezi API a daným excipientem.

#### 4.1.3.1 Přípravek s obsahem clopidogrelu

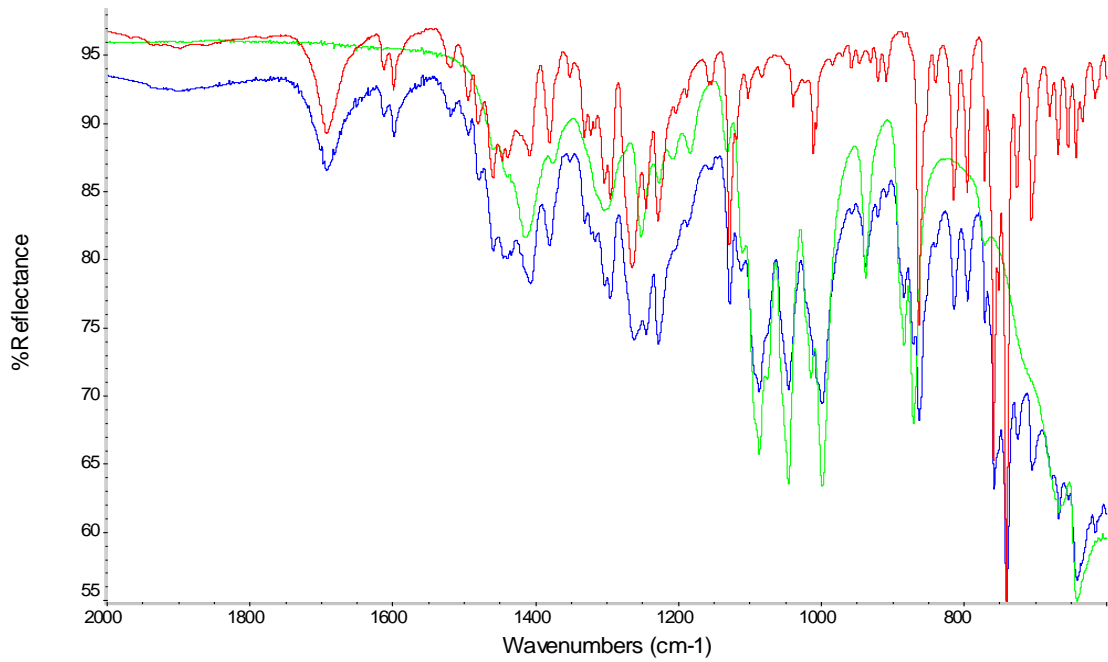


**Obr. 18:** Spektra: API (Clopidogrel hydrogensulfát); **modrá**  
API + Laktóza anhydrát; **červená**  
Laktóza anhydrát; **zelená**

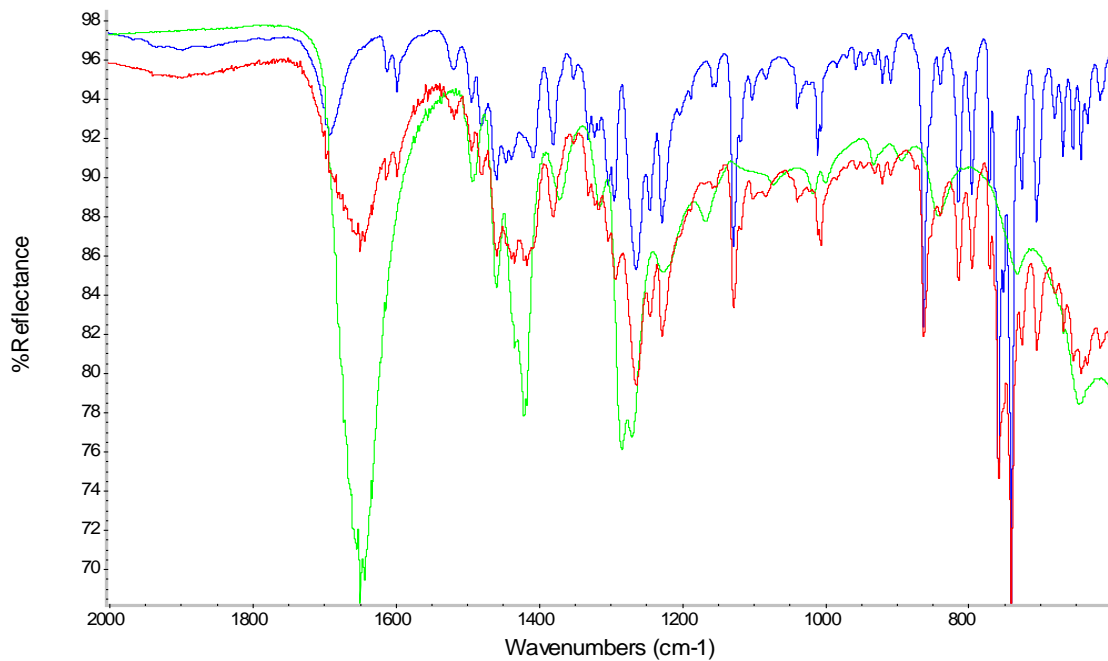


**Obr. 19:** Spektra: API (Clopidogrel hydrogensulfát); **modrá**  
API + Mikrokrystalická celulóza; **červená**  
Mikrokrystalická celulóza; **zelená**

#### 4.1.3.2. Přípravek s obsahem telmisartanu



**Obr. 20:** Spektra: API (Telmisartan); **červená**  
API + Sorbitol; **modrá**  
Sorbitol; **zelená**

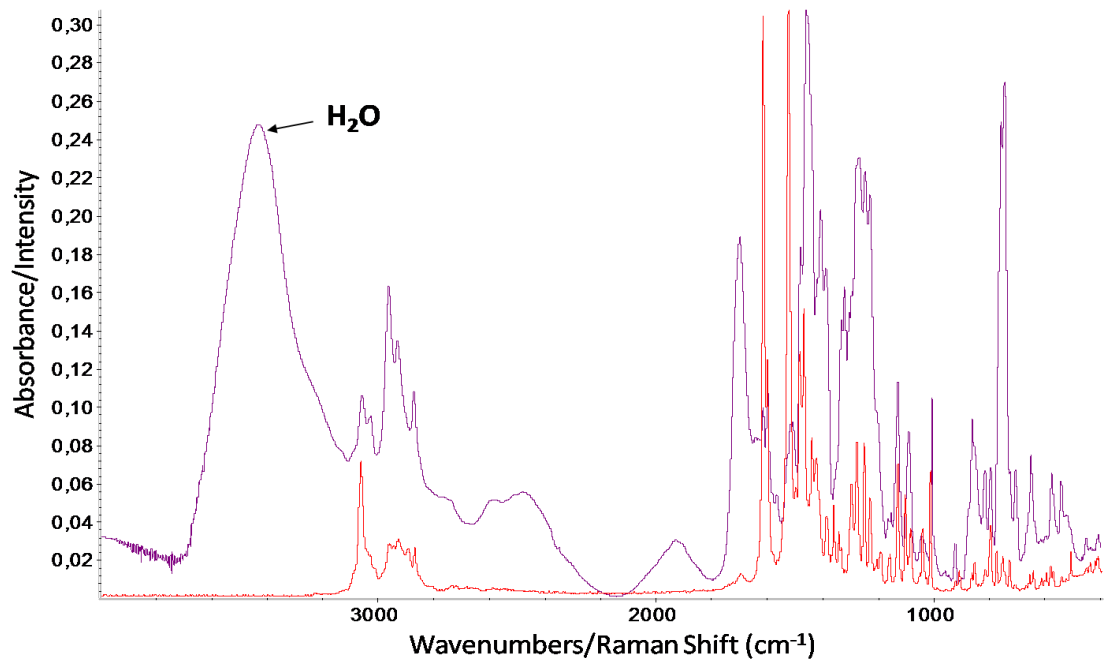


**Obr. 21:** Spektra: API (Telmisartan); **modrá**  
API + Povidon; **červená**  
Povidon; **zelená**

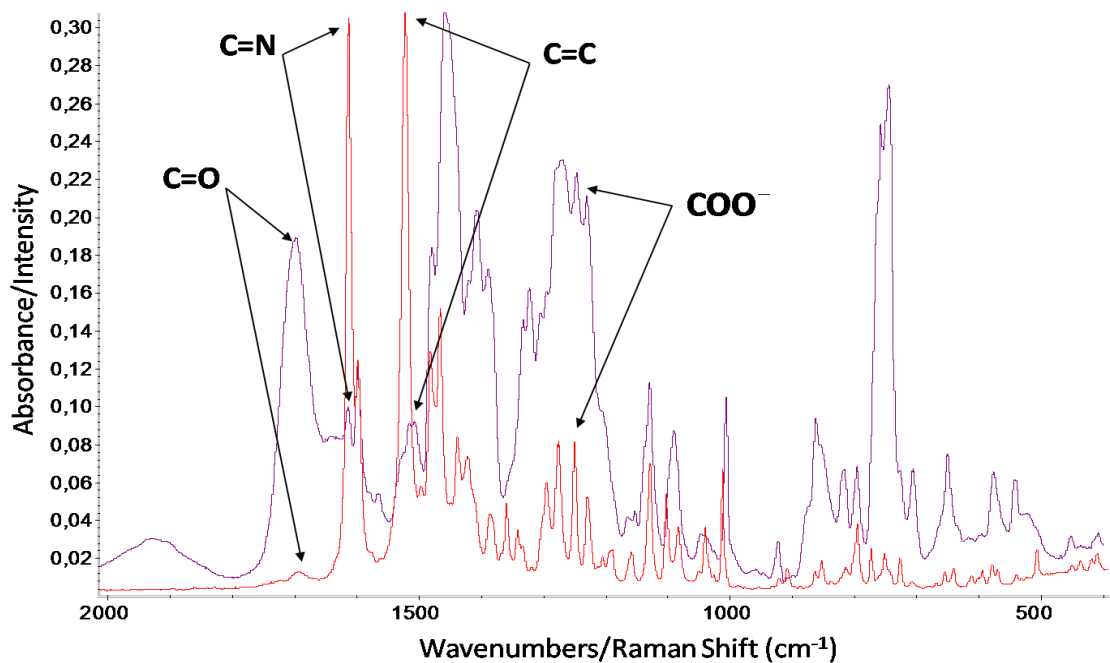
## 4.2 Ramanova spektra

Ve spektrech na *Obr. 22* a *23* je znázorněno, jakým způsobem se IR a Ramanova spektrometrie doplňují. Většinou jsou výrazné absorpční pásy u IR znázorněny slabě u Ramanových spekter a naopak. V našem případě je tento fenomén ilustrován na příkladu funkčních skupin karbonylu, karboxylu a vazeb C=C a C=N.

Výrazný pás v IR  $\nu = 3430 \text{ cm}^{-1}$  ve spektru na *Obr. 22* je způsoben vlhkostí (pravděpodobně v KBr, který je silně hygroskopický), naproti tomu u Ramanového spektra je vliv vlhkosti zanedbatelný. Další předností Ramanovy spektrometrie je možnost měřit přes obal (v tomto případě přes skleněné vialky).



*Obr. 22:* Ilustruje komplementaritu obou technik, IR a Ramanovy spektrometrie, jedná se o spektrum telmisartanu API: **červená** – Ramanovo spektrum  
**fialová** – FT-IR transmisní spektrum



*Obr. 23:* Jedná se o výřez spekter z *Obr. 22*



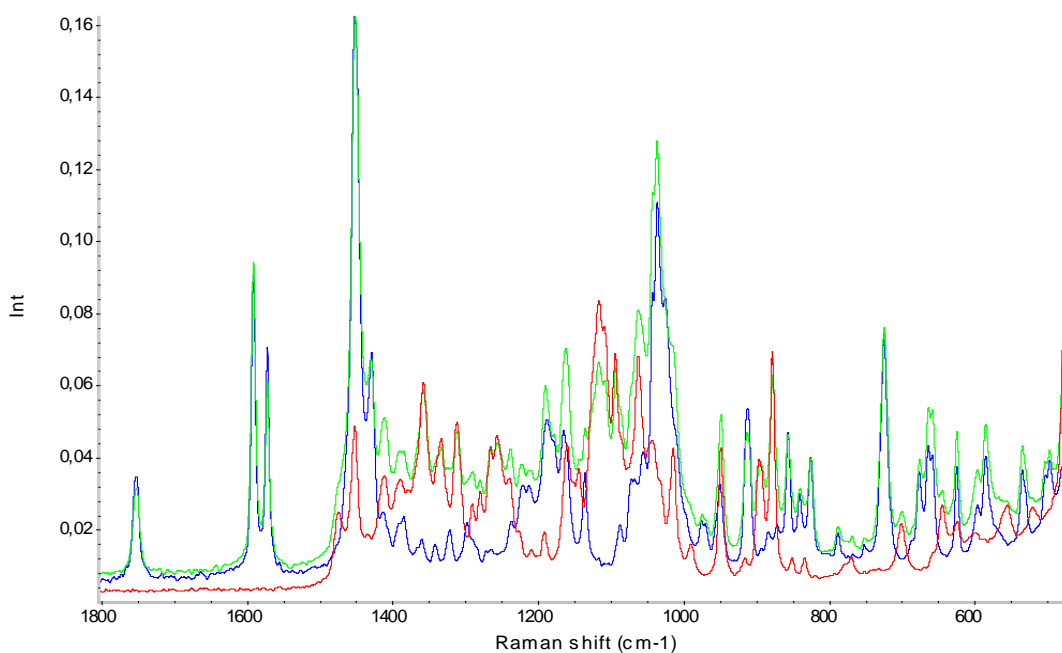
#### **4.2.1. Studium případných kvalitativních změn API ve formulovaných přípravcích pomocí Ramanovy spektrometrie**

V neposlední řadě byla kvalita API ve formulovaných přípravcích studována Ramanovou spektrometrií, byly měřeny vzorky připravené podle schématu v *Tab. 4*. V sekci výsledky jsou však prezentována jen spektra významných excipientů (stejně vzorky jako u techniky FT-IR ATR).

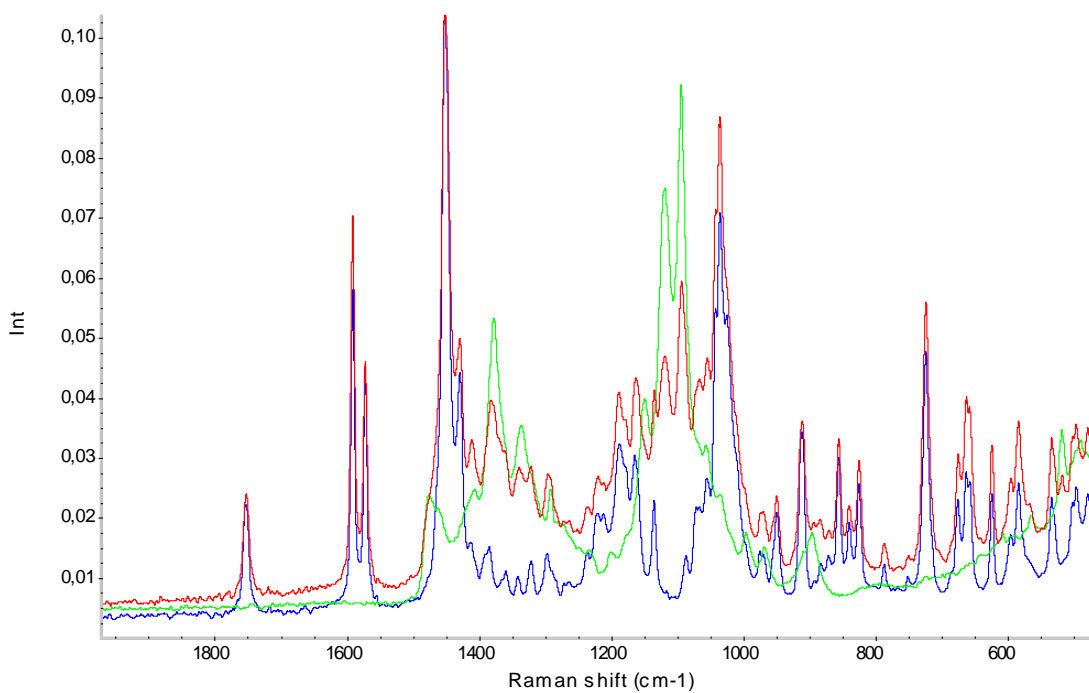
Na základě spekter uvedených v *Obr. 24 – 27* bylo zjištěno, že nedochází ke změnám ve spektru směsi oproti prostému součtu spekter jednotlivých složek. Nedochází ke vzniku nových pásů, nedochází k jejich posunům nebo vymizení. Nejsou pozorovány změny, které by byly zapříčiněny případnými nežádoucími interakcemi mezi API a daným excipientem.

Navíc zde jednoznačně oceníme velký rozdíl v intenzitách charakteristických skupin typu dvojných vazeb a vazeb typu C=N u molekuly API, jež mají velikou intenzitu právě v Ramanově spektru. Tyto skupiny se naopak v molekulách excipientů většinou nevyskytují a ve spektrech neinterferují se spektrem API v lékové formě. Této skutečnosti se velice často využívá<sup>34</sup>.

#### 4.2.1.1 Přípravek s obsahem clopidogrelu

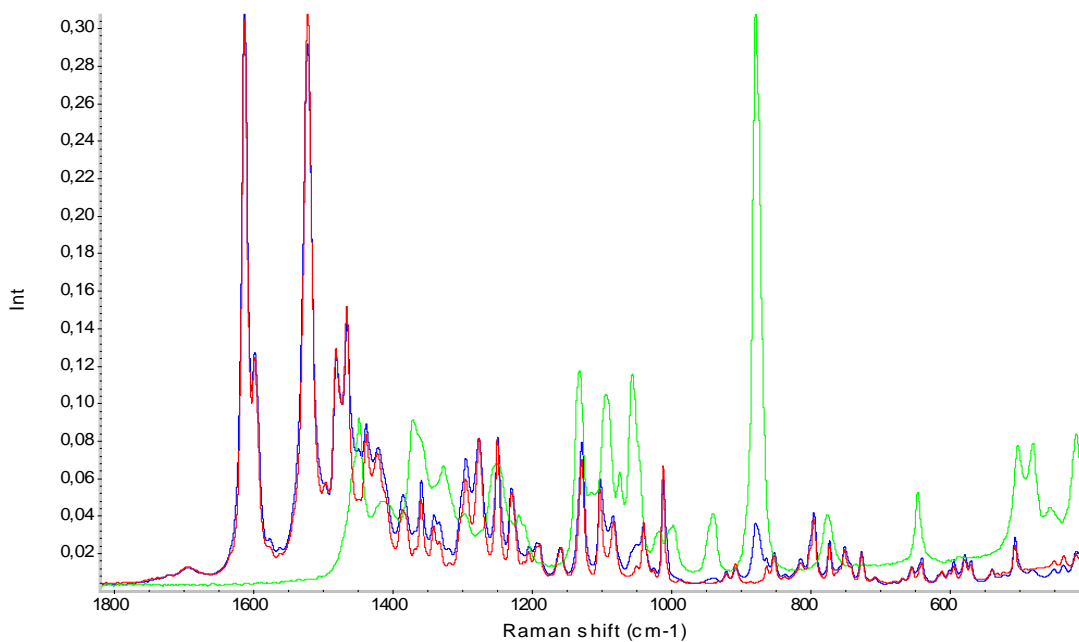


**Obr. 24:** Spektra: API (Clopidogrel hydrogensulfát); **modrá**  
API + Laktóza anhydrát; **zelená**  
Laktóza anhydrát; **červená**

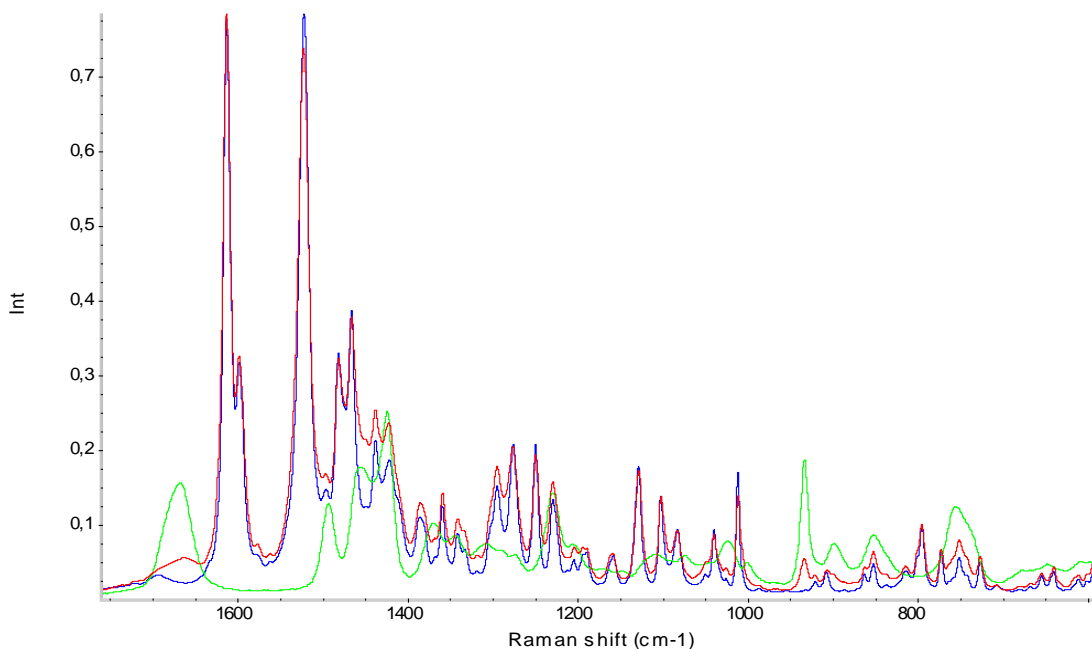


**Obr. 25:** Spektra: API (Clopidogrel hydrogensulfát); **modrá**  
API + Mikrokrytalická celulóza; **červená**  
Mikrokrytalická celulóza; **zelená**

#### 4.2.1.2 Přípravek s obsahem telmisartanu



**Obr. 26:** Spektra: API (Telmisartan); **červená**  
API + Sorbitol; **modrá**  
Sorbitol; **zelená**



**Obr. 27:** Spektra: API (Telmisartan); **modrá**  
API + Povidon; **červená**  
Povidon; **zelená**

## 5. ZÁVĚR

V rigorózní práci byly popsány základní prvky preformulačního vývoje léčiv, zároveň byly charakterizovány moderní analytické metody používané v průběhu vývoje léčiv a rutinní kontrole jak účinných a pomocných látek tak i finálních přípravků, a to především v pevné fázi. Bylo poukázáno na důležitost hodnocení v pevné fázi, jak s ohledem na možné směry k patentovému krytí, tak na možná úskalí během formulace přípravku.

Na příkladu telmisartanu bylo pomocí FT-IR ATR ukázáno na rozdíl ve spektru volné kyseliny a její soli, zde konkrétně soli sodné.

Na základě FT-IR ATR a transmisního měření byly přiřazeny základní charakteristické pásy u obou API (telmisartan kyselina a clopidogrel).

Bylo provedeno studium případných interakcí/inkompatibilit mezi účinnou látkou (API) a pomocnými látkami ve finálním formulovaném přípravku pomocí FT-IR transmisního měření. Ve spektru finální lékové formy nebyly pozorovány změny oproti spektrům jednotlivých složek (API a excipientů). API je tedy v přípravku v nezměněné formě, a tedy ve standardní kvalitě.

Studium případných negativních vlivů excipientů na kvalitu API bylo provedeno pomocí FT-IR ATR techniky a Ramanovy spektrometrie. V obou případech nebyl zaznamenán vznik žádného významného nového pásu nebo posun, či vymizení pásů stávajících, což by indikovalo kvalitativní změny API.

K žádným změnám ve kvalitě API v obou přípravcích tedy na základě těchto měření nedochází.

## Seznam literatury

---

1. K. Metyš, P. Balog; Marketing ve farmacii, Grada, 2006
2. WHO, World health report 2008; <http://www.who.int/whr/2008/summary.pdf>
3. P. Komárek, M. Rabišková et al.; Technologie léků, Galen, třetí přepracované a doplněné vydání, 2006
4. Jiří Klimeš; přednáška: Současné pojetí oboru analýza léčiv, Stabilita léčiv, 2008
5. Bohumil Kratochvíl, VŠCHT v Praze; Polymorfismus pevných farmaceutických substancí (Program celoživotního vzdělávání, 22. – 23. 3. 2007)
6. AW. Newman, SR. Byrn; *Drug. Discov. Today*, **2003**, 8(19), 898-905
7. U. Holzgrabe, BW. Diehl, I. Wawer; *J. Pharm. Biomed. Anal.*; **1998**, 17(4-5), 557-616
8. JL. Ford; *Int. J. Pharm.*; **1999**, 179(2), 209-28
9. Pavel Klouda; Moderní analytické metody; nakladatelství Klouda, Ostrava, 2003
10. Jiří Dohnal, Tatjana Grafnetterová, Veronika Grünwaldová, Jaroslav Havlíček, Josef Jampílek, Tomáš Pekárek a kol.; Moderní přístupy k farmaceutické analýze 2, Strukturní analýza léčiv, Veterinární a farmaceutická univerzita Brno, Brno 2009
11. Brian C Smith; Fundamentals of Fourier Transform Infrared Spectroscopy; CRC Press, 2000

- 
12. John R. Ferraro, Kazuo Nakamoto, Chris W. Brown; *Introductory Raman Spectroscopy*, 2<sup>nd</sup> edition, Academic Press, 2003
  13. <http://orgchem.colorado.edu/hndbksupport/irtutor/tutorial.html>; 12/2009
  14. Alice Lázníčková, Vladimír Kubiček; *Základy fyzikální chemie (vybrané kapitoly pro posluchače farmaceutické fakulty)*; Karolinum; 2001
  15. Jiří Klimeš a kolektiv; *Kontrola léčiv I.*; Karolinum; 2006
  16. <http://www.nuance.northwestern.edu/KeckII/ftir2.asp>, 12/2009
  17. J. Cruz, M. Bautista, JM. Amigo, M. Blanco; *Talanta*, **2009**, 80(2), 473-8
  18. T. Puchert, D. Lochmann, JC. Menezes, G. Reich; *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **2010**, 51(1), 138-45
  19. H. Shinzawa, K. Awa, Y. Ozaki, H. Sato; *Appl Spectrosc*, **2009**, 63(8), 974-7
  20. <http://carbon.cudenver.edu/public/chemistry/classes/chem4538/raman.htm>;  
12/2009
  21. M. Windbergs, M. Haaser, CM. McGoverin, et al.; *J. Pharm. Sci.*; **2010**, 99(3),  
1464-75
  22. Y. Fujimaki, T. Matsubara, T. Sakamoto et al.; *Pharmazie*, **2009**,  
64(5),316-22
  23. <http://www.solvias.ch/english/services-products/polymorphism-salts-crystallization/index.html>, 10/2009
  24. <http://www.patentstorm.us/patents/6504030/description.html>; 10/2009

- 
25. Solvias Prospects, 01/2007;  
[http://www.solvias.com/sites/default/files/prospects\\_1\\_2007\\_e\\_.pdf](http://www.solvias.com/sites/default/files/prospects_1_2007_e_.pdf)
  26. Raymond C. Rowe, Paul J. Sheskey, Sian C. Owen; Handbook of Pharmaceutical Excipients, 5th Edition, Pharmaceutical Press, 2006
  27. <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/ProductDetail.do?lang=en&N4=T8949>;  
9/2009
  28. H. Lüllmann, K. Mohr, M. Wehling; Farmakologie a toxikologie, Grada, 1999
  29. Aislp SPC, Micardis 80 mg tablety, 2009
  30. <http://www.bmb.leeds.ac.uk/illingworth/cardio/targets.gif>; 9/2009
  31. <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/ProductDetail.do>; 9/2009
  32. Merck Index
  33. Aislp SPC, Plavix 75 mg potahované tablety, 2009
  34. M. de Veij, P. Vandenabeele, T. de Beer et al.; *J Raman Spectr.*, **2007**, 40,  
297 - 307