

Univerzita Karlova
Farmaceutická fakulta v Hradci Králové
Katedra analytické chemie

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

**Využití Ramanovy spektrometrie v analýze biologicky
aktivních látek**

(rešeršní práce)

Vedoucí bakalářské práce:

doc. PharmDr. Ludmila Matysová, Ph.D.

Prohlášení

Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpal, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány. Práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

v Hradci Králové

Podpis

Poděkování

Zde bych ráda poděkovala doc. PharmDr. Ludmile Matysové, Ph.D. za odborné rady a připomínky, vstřícnost, výbornou komunikaci a pomoc při vypracování této bakalářské práce.

OBSAH

SEZNAM ZKRATEK	i
CÍL A ZADÁNÍ PRÁCE	ii
ÚVOD	7
1. RAMANOVA SPEKTROMETRIE	8
1.1 Metody vibračně-rotační spektroskopie	8
1.1.1 RS – metoda vibračně-rotační spektroskopie	8
1.1.2 Vznik Ramanova a infračerveného spektra	8
1.1.3 Infračervená spektroskopie – metoda vibračně-rotační spektroskopie	11
1.2 Instrumentace Ramanových spektrometrů	14
1.2.1 Disperzní Ramanův spektrometr	14
1.2.2 Ramanův spektrometr s Fourierovou transformací	15
1.2.3 Ramanova mikrospektrometrie	16
1.2.4 Rezonanční Ramanova spektrometrie	16
1.2.5 Povrchově zesílená Ramanova spektrometrie	16
1.3 Využití Ramanovy spektrometrie	17
2. BIOLOGICKY AKTIVNÍ LÁTKY	20
2.1 Cesta a působení cizorodých látek a jejich metabolitů v organismu	20
2.2 Biologicky aktivní látky přijímané potravou	20
2.3 Léčiva, pesticidy, bojové chemické látky, jedy a drogy	21
3. ANALÝZA BIOLOGICKY AKTIVNÍCH LÁTEK POMOCÍ RAMANOVOY SPEKTROMETRIE	23
3.1 Analýza falešných léků – antimalarika, Viagra	23
3.2 Kontrola kvality šumivých léčiv	24
3.3 Mapování tablety Aspirinu	25
3.4 Stanovení obsahu mléčného tuku	26
3.5 Stanovení methanolu	28
3.6 Identifikace Kokainu v textiliích	31
3.7 Identifikace Modafenu přes obal	33
3.8 Identifikace antibiotik pomocí SERS	34
3.9 Identifikace a distribuce složek hypolipidemik	35
ZÁVĚR	40
SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	41

SEZNAM ZKRATEK

RS – Ramanova spektrometrie

IR – infračervená (z angl. infrared) oblast

λ – vlnová délka

FTIR spektrometr – infračervený spektrometr s Fourierovou transformací

CCl₄ – tetrachlormethan

CHCl₃ – trichlormethan (chloroform)

CS₂ – methandithion

FTRS spektrometr – Ramanův spektrometr s Fourierovou transformací

2D – dvourozměrný

3D – trojrozměrný

AMK – aminokyselina

LSD – diethylamid kyseliny lysergové

API – aktivní farmaceutická látka

RIAS – přenosný Ramanův spektrometr v pouzdře (z angl. Raman-in-a-suitcase)

ATB – antibiotikum

LP – lipoproteiny

LDL – lipoproteiny s nízkou denzitou (z angl. Low Density Lipoproteins)

HDL – lipoproteiny s vysokou denzitou (z angl. High Density Lipoproteins)

CÍL A ZADÁNÍ PRÁCE

Cílem a zadáním této bakalářské práce je vyhledat a nahromadit data o Ramanově spektrometrii jako metodě pro identifikaci a stanovení nejrůznějších látek, ale přednostně biologicky aktivních látek.

ÚVOD

Ramanova spektrometrie je metoda molekulové rotačně-vibrační spektroskopie. Je založena na interakci fotonů monochromatického záření s molekulami analytu, čímž vzniká rozptyl záření po průchodu látkou, který měříme a dochází tak ke změnám rotačně-vibračních energetických stavů molekul. Jedná se o výměnu určité energie mezi elektromagnetickým zářením a molekulami analyzované látky. RS má rychlý průběh, jehož výsledkem je Ramanovo spektrum, pomocí kterého zjišťujeme kvalitativní i kvantitativní informace o zkoumané látce. Analyzovaná látka může být původem anorganická i organická a ve skupenství plynném, kapalném nebo pevném.

V praxi se uplatňuje v nejrůznějších oblastech, například pro analýzy v přírodních vědách, ve farmaceutickém, kosmetickém či chemickém průmyslu, dále se aplikuje v geologii, také pro rozbory uměleckých děl a kovových slitin.

V této práci se zaměřuji zejména na využití RS při analýze biologicky aktivních látek ze vzorku pro jejich identifikaci.

Tato metoda se stále vyvíjí a novými poznatky se zvyšuje její citlivost. Často se používá v kombinaci s infračervenou spektroskopií či s mikrosondami Ramanova mikroskopu [1].

1. RAMANOVA SPEKTROMETRIE

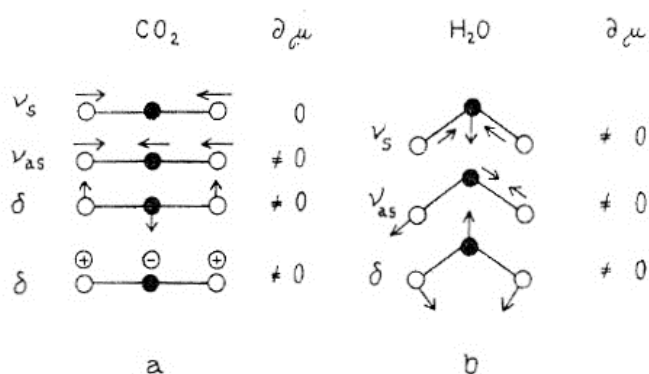
Ramanova spektrometrie je analytická nedestruktivní metoda, která se řadí mezi optické metody. Optické metody obecně využívají reakce elektromagnetického záření s analytem a konkrétně RS je metoda, založená na změně záření při průchodu vzorkem [2].

1.1 METODY VIBRAČNĚ-ROTAČNÍ SPEKTROSKOPIE

1.1.1 RS – METODA VIBRAČNĚ-ROTAČNÍ SPEKTROSKOPIE

Podstatou principu Ramanovy spektrometrie je ozáření vzorku s analytem monochromatickým zářením z laserového zdroje ve viditelné či blízké infračervené oblasti, na základě kterého vzniká rozptyl světla a současné změny vibračních a rotačních stavů molekul vzorku. Dochází ke změnám volného pohybu molekul v prostoru a také ke změně vzájemné polohy a úhlů vazeb atomů molekul, ke kterým může dojít při rotaci molekuly kolem jejího těžiště či pravidelnými vibracemi atomů v molekule. Vibracemi se atomy molekul od sebe navzájem oddalují a přibližují [3].

Na následujícím obr. 1 jsou uvedeny možnosti vibrací oxidu uhličitého a vody:



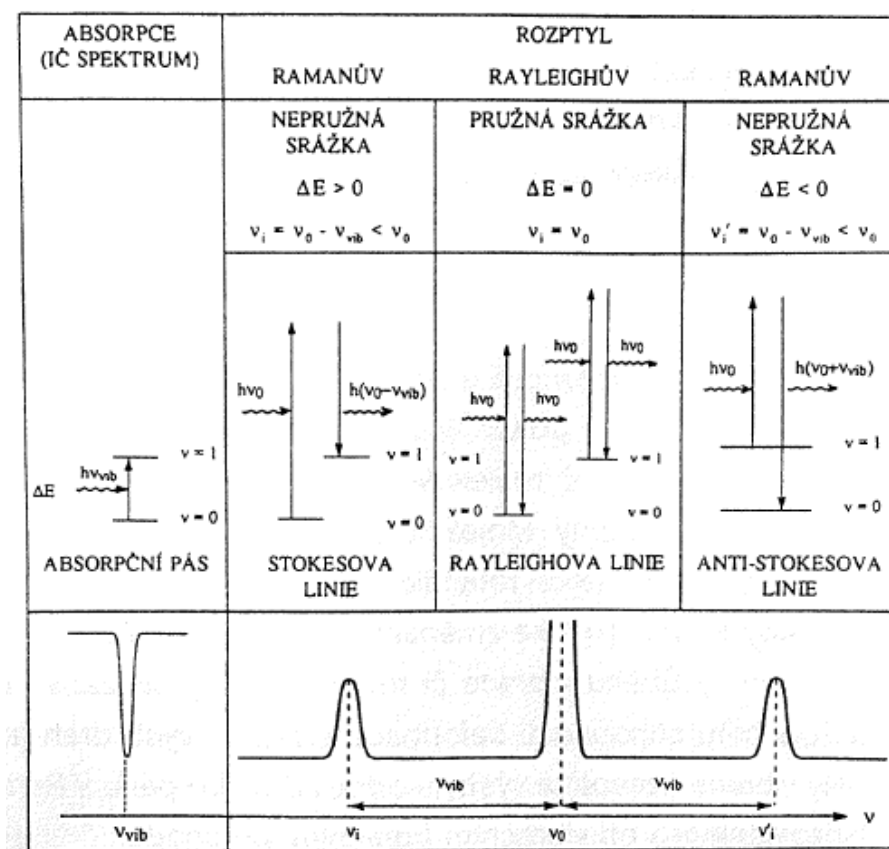
Obr. 1 Základní vibrace CO_2 (a) a vody (b), převzato z [1]

1.1.2 VZNIK RAMANOVA A INFRAČERVENÉHO SPEKTRA

Rozptyl světla, který ozářením vzorku vzniká, může být elastický (Rayleighův) nebo neelastický (Ramanův). Při elastickém rozptylu dojde ke srážce fotonu záření o frekvenci ν_0 s molekulou analytu. Po srážce foton změni směr, ale nedochází k výměně

energie mezi nimi, takže rozptyl má stále stejnou vlnovou délku (nezměněný vlnčet) U_0 . Tento rozptyl popsal britský fyzik Lord John W. Rayleigh, po kterém je pojmenován [4].

Naopak při neelastickém rozptylu dochází k výměně energie při srážce fotonu s molekulou. První možností výměny energie je, že foton předá molekule menší energii – tedy rozptýlené záření bude mít nižší vlnčet než U_0 , a to znamená delší vlnovou délku, protože část energie byla spotřebována na zvýšení vibrační energie molekuly. Toto rozptýlené záření zobrazují čáry ve Stokesově oblasti spektra. Druhou možností je, že molekula předá fotonu vyšší energii, což znamená, že rozptýlené záření bude mít vyšší vlnčet než U_0 . Bude mít tedy kratší vlnovou délku, protože foton převezme vibrační energii od molekuly. Tento rozptyl zobrazují čáry v Anti-Stokesově oblasti. Anti-Stokesův rozptyl je méně pravděpodobný a má menší intenzitu než Stokesův rozptyl, protože velmi málo molekul má před excitací vyšší vibrační energii za normální teploty. Energetické přechody a jednotlivé linie vzniku Ramanova spektra zobrazuje obr. 2 [5].



Obr. 2 Energetické přechody a vznik Ramanova spektra, převzato z [1]

Neelastický rozptyl byl předpovězen v roce 1923 rakouským fyzikem Adolfem G. S. Smekalem a potvrdil jej v roce 1928 indický fyzik Sir Chandrasekhara Venkata Raman pomocí rozptylu slunečního záření na molekulách vody. V roce 1930 Sir Raman obdržel za experimentální objev Ramanova jevu Nobelovu cenu za fyziku. Ramanův rozptyl je také nazýván jako Smekalův-Ramanův či kombinační rozptyl [6].

Pro vznik Ramanova jevu je nutné, aby při vibračním pohybu došlo ke změně polarizovatelnosti. K takovéto změně dochází, pokud jsou elektrické náboje v molekulách schopné posunu (umístění) v molekule vlivem elektrického pole. Když schopnost posunu elektrické náboje při vibracích nemají, vznikne pouze Rayleighův rozptyl a vibrace se v pásech Ramanova spektra neprojeví. Následující rovnice vyjadřuje nenulovou změnu polarizovatelnosti při vibraci pro vznik Ramanova jevu:

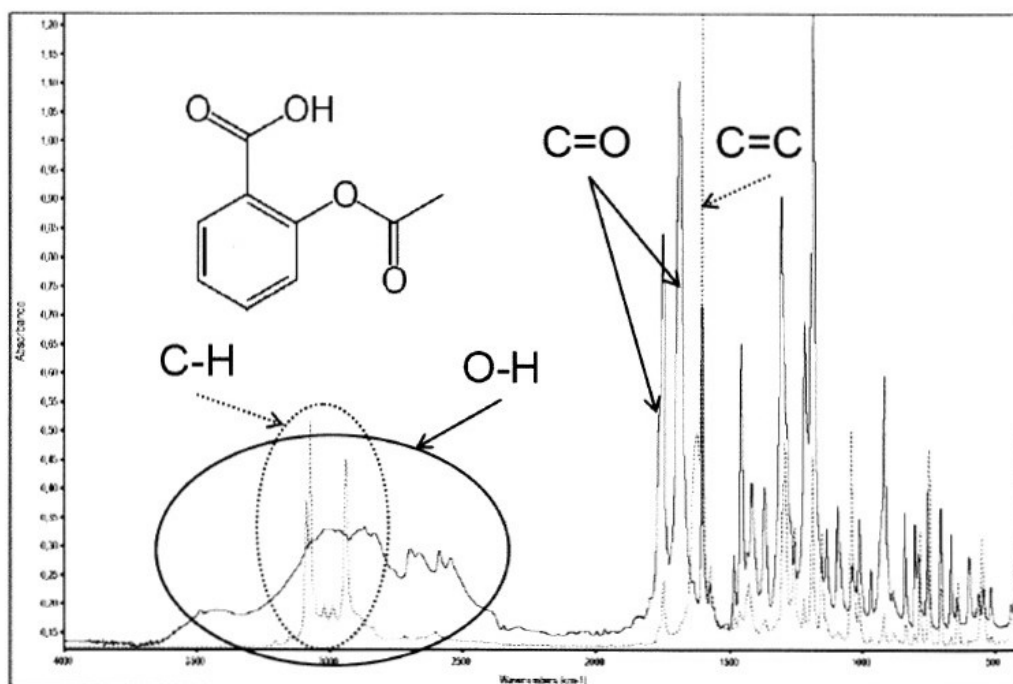
$$\delta_{\alpha} / \delta_q \neq 0$$

ve které platí, že δ_{α} je změna polarizovatelnosti a δ_q vyjadřuje změnu posunu elektrických nábojů v molekule. Polarizovatelnost α popisuje schopnost posunu elektronových drah a míru rozložení náboje v molekule vlivem elektrického pole [7].

V Ramanově spektru je intenzita pásů úměrná druhé mocnině změny polarizovatelnosti $(\delta_{\alpha}/\delta_q)^2$, což znamená, že intenzivními pásy se projevují vibrace nepolárních vazeb s centrem symetrie C-C, C=C a C≡C, které jsou schopné změnit polarizovatelnost molekul. Vždy platí, že vibrace aktivní v Ramanovo spektru se neprojeví ve spektru infračerveném. Pro aktivaci vibračního pohybu v infračerveném spektru je nezbytná změna dipólového momentu molekuly při přechodu do vyššího vibračního stavu. Intenzita pásů v IR spektru je úměrná druhé mocnině dipólového momentu $(\delta_p/\delta_q)^2$, ve kterém δ_p vyjadřuje změnu dipólmomentu. Intenzivní pásy infračerveného spektra zobrazují vibrace molekul s polárními funkčními skupinami O-H, N-H a C=O.

Obecně lze říci, že aktivní vibrace se intenzivně projeví pouze na pásu infračerveném nebo pouze na Ramanovo pásu, ne v obou zároveň. Pro molekuly s vysokou symetrií se stávají spektra infračervené a Ramanovo navzájem komplementárními (doplňující se), a tak můžeme zjistit kompletní informace o vzorku.

Následující obr. 3 srovnává IR a Ramanovo spektrum kys. acetylsalicylové a šipkami poukazuje na dvě maxima C=O skupiny (esteru a kyseliny) v infračerveném spektru. V Ramanovo spektru vyniká pás s nepolární dvojnou vazbou C=C, odpovídající vibracím molekul aromatického kruhu. Intenzita Ramanových pásů je popisována jejich výškou či plochou. [8].



Obr. 3 Srovnání IR a Ramanova spektra kys. acetylsalicylové (IR spektrum plná čára, Ramanovo s. tečkovaně), převzato z [8]

1.1.3 INFRAČERVENÁ SPEKTROSKOPIE – METODA VIBRAČNĚ-ROTAČNÍ SPEKTROSKOPIE

Infračervená spektroskopie je založena na absorpci infračerveného záření při přechodu z nižšího vibračně-rotačního prostředí do vyššího a odpovídá 0,8 - 1000 μm vlnové délky. Absorpce IR záření vede ke změně vibračního nebo rotačního stavu molekul analyzované látky. U molekul s polárními funkčními skupinami dojde ke změně dipólového momentu a vibrace molekuly se ve spektru projeví jako intenzivní absorpční pás. Vznikají zde valenční nebo deformační vibrace. U valenčních vibrací se mění délka vazby mezi atomy symetricky nebo asymetricky. Při deformačních vibracích se mění vazebný úhel, ale nemění se délka vazby. Rozlišujeme tři typy deformačních vibrací. První z nich je vibrace nůžková, při které se mění valenční úhel dvou vazeb. Druhým

typem je kývavá vibrace probíhající kolmo k rovině účastnících se atomů a posledním typem je vibrace kroutivá, která probíhá kolem osy půlící úhel mezi třemi účastněnými atomy. Tyto tři typy probíhají v rovině vzhledem k okolí nebo se z roviny vychylují a nazývají se mimorovinné [8].

Deformační vibrace se ve spektru vyskytují při nižších vlnočtech, protože na změnu vazebného úhlu stačí méně energie než na změnu délek vazeb mezi atomy u valenčních vibrací. Také platí, že čím jsou atomy těžší, tím dochází k absorpci při nižším vlnočtu a čím je vazba mezi atomy pevnější, tím dojde k absorpci při vyšších vlnočtech. [9].

Infračervené spektrum lze rozdělit na tři oblasti:

- blízká infračervená oblast (NIR, podle angl. near infrared): $12500 - 4000 \text{ cm}^{-1}$, odpovídající $\lambda 0,8 - 2,5 \mu\text{m}$
- střední infračervená oblast (MIR, podle angl. middle infrared): $4000 - 400 \text{ cm}^{-1}$, odpovídající $\lambda 2,5 - 25 \mu\text{m}$
- vzdálená infračervená oblast (FIR, podle angl. far infrared): $400 - 10 \text{ cm}^{-1}$, odpovídající $\lambda 25 - 1000 \mu\text{m}$.

Infračervené záření leží mezi mikrovlnným, které má rozsah vlnových délek $1000 \mu\text{m}$ až 30 cm , a viditelným zářením, které dosahuje $\lambda 0,4 - 0,8 \mu\text{m}$. Největší význam má střední infračervené záření, protože má dostatečnou energii na absorpci záření, se kterou způsobí změnu rotačních a vibračních stavů molekul. Mohou vzniknout změny stavů molekul kombinované vibračně-rotační nebo pouze vibrační či rotační, avšak rotační přechody leží hlavně ve vzdálené infračervené oblasti spektra.

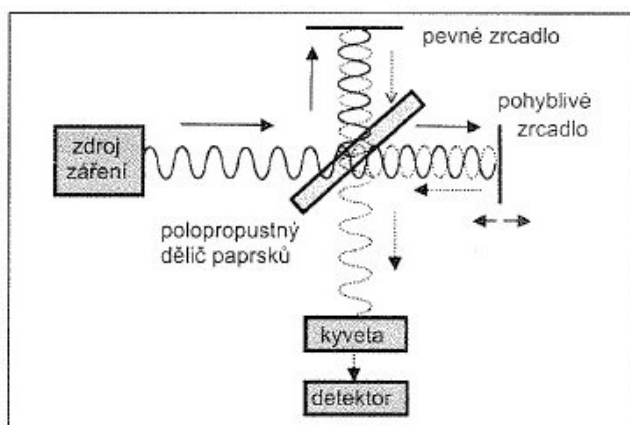
Absorpční pás, který vznikl aktivní vibrací molekul v IR spektru, lze popsat závislostí intenzity absorpce na vlnočtu absorbovaného záření [8].

Instrumentálně starší jsou disperzní přístroje, které jsou jedno nebo dvou paprskové a pracují na základě rozkladu infračerveného záření monochromátorem. Ze zdroje IR záření vychází paprsek, který prochází měrnou (se vzorkem) a srovnávací kyvetou (s rozpouštědlem). Paprsek prochází celou a odráží se od rotujícího zrcadla na vstupní šterbinu monochromátoru, kde se záření spektrálně rozloží. Přes výstupní šterbinu rozložené záření dopadá na detektor, který záření přemění na elektrický signál. Detektor je spojen s vyhodnocujícím zařízením a ten signál upraví do podoby spektra. Primární záření vychází z nichromového zdroje nebo Nernstovy tyčinky. Jako monochromátor se

používá hranol, mřížka, kombinace různých materiálů hranolů nebo kombinace hranolů a mřížky. Detektory jsou založeny na tepelných nebo elektrických účincích.

V současnosti jsou disperzní přístroje nahrazovány infračervenými spektrometry s Fourierovou transformací (FTIR spektrometry), které mají místo monochromátoru Michelsonovův interferometr. Tyto spektrometry pracují na principu interference paprsků, kterou se záření z polychromatického zdroje zesiluje nebo zeslabuje. Podle vzdálenosti pohyblivého zrcadla od děliče paprsků se změní vlnová délka zesíleného záření.

Ze zdroje záření vychází paprsek, který se rozděluje v děliči na dva svazky. První část paprsku se od děliče odráží na pevné zrcadlo. Druhá část paprsku prochází polopropustným děličem na zrcadlo pohyblivé. Obě části paprsku se od zrcadel odráží zpět na dělič, kde dojde ke splnutí (interferenci) paprsků a k zesílení záření. Poté paprsek projde skrz kyvetu k detektoru. Signál z detektoru ve formě interferogramu (závislost odezvy detektoru na čase) počítač upraví s použitím Fourierovy transformace na infračervené spektrum. Zdrojem záření je zde elektricky rozzhavená tyčinka z karbidu křemíku (globalar). Konstrukci FTIR spektrometru zobrazuje obr. 4 [2].



Obr. 4 Spektrometr FTIR, převzato z [2]

Oproti disperznímu spektrometru má FTIR spektrometr vyšší rozlišení, rychleji zaznamenává spektrum a nepotřebuje disperzní optiku.

Infračervená spektroskopie měří látky všech skupenství, původem anorganické i organické látky, v úplné čistotě, v roztoku nebo ve směsi. Důležitá je ovšem úprava vzorku. Na analýzu se musí používat bezvodé rozpouštědlo propustné pro IR záření, ve

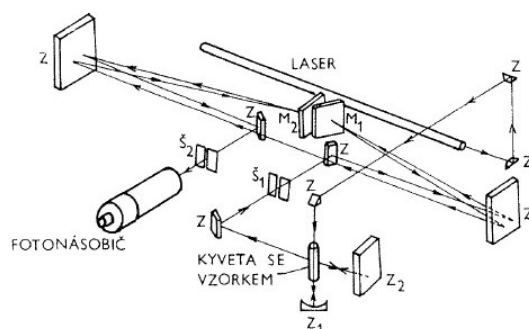
kterém se vzorek dobře rozpustí, ale nebude s ním reagovat. Důležitý je také výběr kyvet a okének cel, které musí být z propustného materiálu pro IR záření. IR spektroskopii můžeme použít pro kvalitativní i kvantitativní analýzu. Při kvalitativní analýze identifikujeme sloučeninu, určíme čistotu látky a její strukturu pomocí porovnání spektra s knihovnou infračervených spekter. Při porovnání musí souhlasit vlnočet, maxima, polohy a tvary absorpčních pásů. Ve spektru se nachází nejméně jeden charakteristický intenzivní pás, pomocí kterého určíme identitu analytu. Kvantitu určíme s použitím Lambert-Beerova zákona (závislost absorbance na koncentraci) a s aplikací vnějšího a vnitřního standardu [8].

1.2 INSTRUMENTACE RAMANOVÝCH SPEKTROMETRŮ

1.2.1 DISPERZNÍ RAMANŮV SPEKTROMETR

Disperzní Ramanovy spektrometry se skládají ze zdroje záření, kyvety, několika zrcadel, jedním nebo více monochromátorů a detektoru. Záření z laseru se odráží v zrcadle a prochází kyvetou se vzorkem. Kolem kyvety jsou zrcadla, na která záření dopadá a odráží se do vstupní štěrbině monochromátoru, kde se světlo rozloží a výstupní štěrbinou dopadá na detektor. Detektorem je fotonásobič, pomocí kterého se rozložené záření zesiluje, registruje a převádí na elektrický signál. Data se zpracovávají ve vestavěném počítači.

Zdrojem monochromatického záření se nejčastěji používá plynový laser (helium-neonový λ 633 nm, argonový λ 488 a 458 nm nebo kryptonový λ 531 a 647 nm), který zajistí intenzivní záření, protože Ramanův rozptyl je velmi slabý. Plynové lasery vyzařují viditelné a blízké infračervené záření inhibující vznik nechtěné fluorescence. Její vznik znemožňuje pozorovat Ramanova spektra. Ve spektrometrech se používají kyvety skleněné nebo křemenné. Soubor zrcadel zachycuje a odráží záření na kyvetu, dále do monochromátoru (difrakční mřížky) a na detektor. Další detektorem používaným u disperzních přístrojů je vícekanálový citlivý detektor CCD (z angl. Charge Coupled Devided), který pracuje za laboratorní teploty. Analyzovat lze jakékoliv skupenství látky a rozpouštědlem vzorku může být například voda, CCl_4 , CHCl_3 nebo CS_2 . Disperzní Ramanův spektrometr na obr. 5 [1; 2; 8].

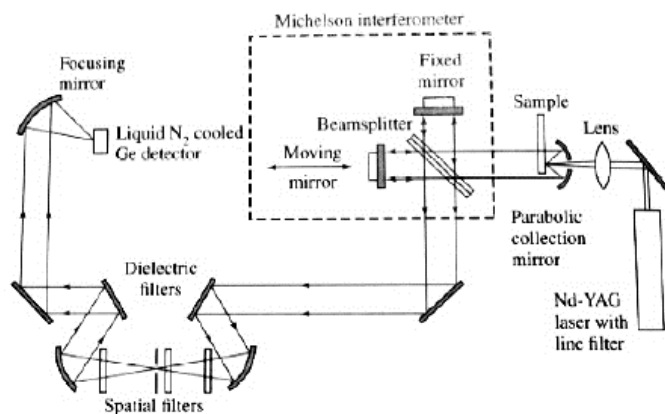


Obr. 5 Blokové schéma Ramanova spektrometru, převzato z [1]

1.2.2 RAMANŮV SPEKTROMETR S FOURIEROVOU TRANSFORMACÍ

Ramanův spektrometr s Fourierovou transformací (obr. 6) je velmi podobný FTIR spektrometru.

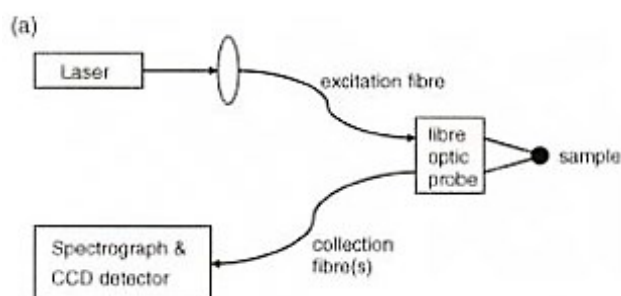
Používaným zdrojem záření je neodymový YAG (ytrium-aluminium-granát) pevnolátkový laser (λ 1064 nm), který vyzařuje záření v blízké infračervené oblasti s nižší energií, než má záření viditelné. Záření prochází skrz optiku a kyvetu se vzorkem do interferometru a dále do detektoru. Obvykle se využívají velmi citlivé germaniové detektory, které se chladí kapalným dusíkem, nebo detektory ze sloučeniny InGaAs (indium-gallium-arsenid) detekující vzorek za laboratorní teploty. Tento detektor vyniká nízkým šumem (odchylkou výšky absorpčního pásu) a vysokou rychlostí odezvy. Signál z detektoru (interferogram) je upraven v počítači s pomocí Fourierovy transformace na Ramanovo spektrum. Jeho výhodou oproti disperznímu přístroji je, že zde použitý laser snižuje fluorescenci, která by mohla překrýt a znehodnotit Ramanův rozptyl a je přesnější díky přítomnému interferometru s Fourierovou transformací. [8; 10].



Obr. 6 Ramanův spektrometr s Fourierovou transformací, převzato z [10]

1.2.3 RAMANOVA MIKROSPEKTROMETRIE

Jedná se o spojení Ramanova spektrometru s mikrosondou a s optickými křemennými vlákny (obr. 7). Vzdálenost vzorku na podložce od optické sondy musí být taková, aby se rozptýlené záření odráželo skrz optiku na vstupní štěrbinu disperzního spektrometru nebo vstupu interferometru FTRS spektrometru. Spojení spektrometru s mikroskopem dokáže změřit velmi malé částice (pro analýzy stopového množství ve vzorku), zmapovat povrch a vyhodnotit jednotlivé složky. Velkou výhodou je hloubkové profilování vzorku, kde mikroskop zaostří jednotlivé vrstvy vzorku a výsledkem je 2D a 3D spektrum. Podle druhu matrice volíme lasery méně či více výkonné, aby se předešlo vzniku nežádoucí fluorescence, přehřátí a tepelné degradaci vzorku [1; 8; 10].



Obr. 7 Sonda s optickým vláknem, převzato z [10]

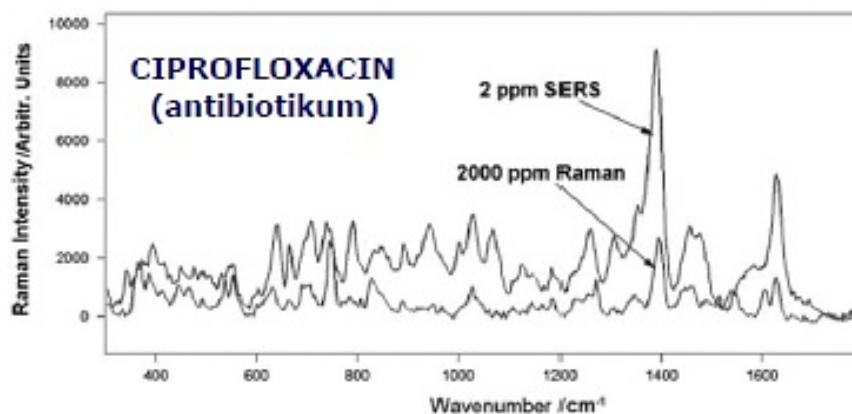
1.2.4 REZONANČNÍ RAMANOVA SPEKTROMETRIE

Rezonanční Ramanova spektrometrie je technika se zvýšenou citlivostí. Využívá laditelného barvivového laseru s vlnovou délkou, při které se světlo absorbuje, následně vzniká fluorescence a také dochází k pohybu náboje v molekule, což způsobuje zvýšenou intenzitu Ramanova rozptylu 100 – 1000krát. Ze zdroje vychází záření v podobě krátkých pulsů (10^{-12} s), které umožňují srovnat signál během pulsu se signálem po jeho skončení (10^{-9} s), kdy se ještě ukazuje fluorescence, ale neprojevuje se Ramanův rozptyl [1; 8].

1.2.5 POVRCHOVĚ ZESÍLENÁ RAMANOVA SPEKTROMETRIE

Technika SERS (z angl. Surface-Enhanced Raman Scattering) využívá zdrsňelého povrchu, který je pokryt nanočásticemi zlata, stříbra, ale také mědi nebo platiny. Na kovový povrch se váží molekuly vzorku, přes které prochází laserové záření a působením chemického a elektromagnetického mechanismu vzniká zesílený Ramanův rozptyl více

než 10^4 (obr. 8). Povrchové nanočástice způsobují snížení vzniklé a nežádoucí fluorescence. Předpokládá se, že zesílení vzniká přenosem náboje mezi molekulou a povrchem a také kvůli zakřivení povrchu se silným elektrickým polem v blízkosti nanočástic kovů. Při spojení technik Rezonanční RS a Povrchem zesílené RS (SE(R)RS – Rezonanční povrchem zesílená RS) lze měřit i velmi malá množství a koncentrace vzorku až po jednotlivé molekuly. SERS detekce je velmi rychlá, citlivá a využívá se i v mobilních přenosných spektrometrech [5; 6].



Obr. 8 Srovnání Ramanova a SERS spektra Ciprofloxacinu, převzato z [5]

1.3 VYUŽITÍ RAMANOVY SPEKTROMETRIE

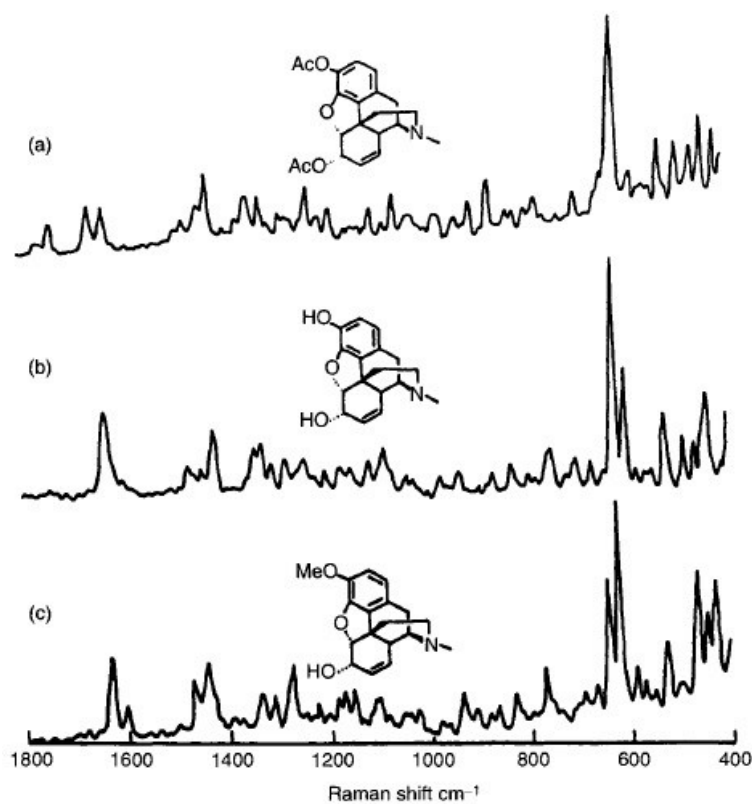
RS poskytuje strukturní informace o analyzovaných organických i anorganických látkách ve všech skupenstvích. Spektrometry lze využít pro kvalitativní i kvantitativní analýzy.

Ve farmaceutickém průmyslu RS slouží ke zjištění složení, čistoty práškových léčiv a koncentrace aktivních látek ve vzorku. Mikrospektrometr zmapuje celý povrch tablety či ampule a detekuje je do hloubky, což umožňuje vyhodnotit zastoupení jednotlivých složek vzorku. Lze takto i určit zda jde původem o originální nebo padělaná farmaka a kontrolovat kvalitu vstupních látek i hotových léčiv. V kontrole kvality a určení původu se metoda využívá také v kosmetickém a potravinářském průmyslu a to například u potravin, jako jsou přírodní barviva, maso, ovoce, zelenina kakao nebo med.

V medicínských, biologických a klinických aplikacích *in vivo*, *in vitro* se RS používá při analýzách DNA/RNA, proteinů a peptidů, jednotlivých buněk, struktur kostí a určování jejich kvality. Dále se za pomoci spektrometru sledují interakce léčiv a jedů

s buňkami, například při testování antibiotik. Lze s nimi také porovnávat zdravé a karcinogenní tkáně, analyzovat pigmentová znaménka na pokožce pro včasný záchyt možného melanomu, monitorovat působení cizorodých látek na kůži a detekovat patogenní mikroorganismy. Při studiích peptidů lze sledovat symetrické S-S vibrace disulfidických můstků.

V geologii dobře identifikuje horniny, minerály, drahokamy, mimozemská tělesa a využití nachází také v archeologii. Dále detekuje různé kontaminanty životního prostředí ve vzduchu, vodě i zemině. Analyzuje různé polymery, anorganické i organické pigmenty, pojiva, pryskyřice, barvy, laky, ropné produkty, supramolekulární systémy ve vývoji nových materiálů a další. Významnou funkci mají mobilní spektrometry nebo mikrospektrometry u záchranných a ozbrojených složek v terénu a ve forenzních vědách. Při zásahu hasičů u požáru nebo při likvidaci chemické havárie pomocí spektrometru detekují neznámé látky, aby předešli kontaminaci, přehřátí nebo výbuchu látek. Policisté mohou využít spektrometr pro analýzu drog čistých i ve směsi (obr. 9), výbušnin, pašovaných nebezpečných látek, alkoholu na obsah metanolu a to i přes sklo či obalový materiál.



Obr. 9 FTRS spektrum čistých alkaloidů: (a) heroinu, (b) morfinu a (c) kodeinu; 50 skenů; rozlišení 6cm⁻¹; použitý laser o výkonu 200mW, převzato z [7]

Metoda dokáže spolehlivě ověřit totožnost a původ předmětů kulturního dědictví, knih, fresek, soch, obrazů, keramiky a dalších uměleckých předmětů. Další využití má v analýzách anorganických látek, jako jsou povrchy s korozí, křemíkové polovodiče, diamanty, povrchy pevných disků, uhlíkové materiály, těžké kovy a slitiny. Pomáhá tak určit jejich čistotu, kvalitu nebo případnou skrytou vadu, například u polovodičů využívajících se v elektronice [6; 8].

2. BIOLOGICKY AKTIVNÍ LÁTKY

Biologicky aktivní látky jsou exogenní látky, které i v malém množství pozitivně nebo negativně ovlivňují biochemické reakce a životní funkce organismu. Mohou to být aminokyseliny a jejich deriváty, enzymy, sacharidy, lipidy, antioxidanty, vitaminy, probiotika, minerální a stopové prvky. Tyto přírodní látky jsou rostlinného či živočišného původu nebo vyráběné biotechnologicky a přidávané do potravin. Dále jsou to chemická léčiva a jejich metabolity, pesticidy, chemické bojové látky, jedy a drogy [11; 12].

2.1 CESTA A PŮSOBNÍ CIZORODÝCH LÁTEK A JEJICH METABOLITŮ V ORGANISMU

Cizorodá látka (xenobiotikum) se může do organismu dostat několika místy vstupu (perorální, žilní, injekční do svalu nebo podkoží a rektální podání). Při podání ústy a částečně rektálně xenobiotikum podléhá presystémové eliminaci a dostává se do enterohepatálního systému, kde se látka částečně metabolizuje (inaktivuje se, stává se méně toxickou) a až poté vstupuje do systémové cirkulace [13].

Následuje několik kroků pohybu látky v organismu, které popisují farmakokinetické děje – absorpci, distribuci, metabolismus a exkreci. Nejdříve se xenobiotikum rozpustí, absorbuje z místa podání do krve a distribuuje se krevním řečištěm do tkání a orgánů. V místě účinku se látka naváže na receptory (proteinů, enzymů a další) a vyvolá svým působením změnu biochemických reakcí. Další fází je metabolismus látky, který přetváří látku na metabolit biotransformačními enzymy. Poté dochází ke konjugaci exogenního metabolitu s endogenní látkou a vznikne konjugát, který je hydrofilnější, polárnější a organismus jej snadno vyloučí [14; 15].

2.2 BIOLOGICKY AKTIVNÍ LÁTKY PŘIJÍMANÉ POTRAVOU

Z potravy jsou přijímány aminokyseliny, které si organismus neumí sám syntetizovat. AMK tvoří peptidy a proteiny, enzymy biochemických reakcí, hormony a neurotransmitery, obranné imunoglobuliny a spoustu dalších nezbytných metabolitů a produktů [16, 17].

Lipidy slouží hlavně jako stavební prvky buněčných membrán, jsou součástí vitaminů A, D, E, K a mohou být zdrojem energie při nedostatku glukózy ze zásob uložených v tukové tkáni [16].

Vitaminy lze rozdělit na dvě skupiny podle rozpustnosti. Ve vodě jsou rozpustné vitaminy skupiny B a vitamin C a v tucích rozpustné jsou vitaminy A, D, E a K. Tyto látky jsou nutné pro fyziologické funkce organismu. Dále plní funkci koenzymů biochemických reakcí a mají antioxidační účinky [18].

Sacharidy jsou hlavním zdrojem energie pro celé tělo, ale výhradně pro mozek a červené krvinky. Jsou součástí buněčných membrán, jako glykogen se ukládají v játrech a ve svalech. S kolagenem a elastinem tvoří základní hmotu cévních stěn a pojivých tkání [16].

2.3 LÉČIVA, PESTICIDY, BOJOVÉ CHEMICKÉ LÁTKY, JEDY A DROGY

Léčivé látky se podávají za účelem prevence, určení a léčby choroby, zmírnění obtíží nebo k následné regeneraci a podpoře fyziologických funkcí organismu. Lze je dělit na chemoterapeutika a látky, které ovlivňují a upravují chod organismu. Chemoterapeutika ničí parazity, jako jsou bakterie, prvoci, kvasinky, plísňe, viry a červi. Do této skupiny patří i léčiva proti rakovině. Do druhé skupiny léčiv patří látky, které pozměňují nesprávné nebo vadné funkce organismu. Tato léčiva ovlivňují vegetativní či centrální nervový systém nebo také funkce jednotlivých orgánových soustav.

Pesticidy jsou umělá hnojiva sloužící na ochranu rostlin před živočišnými škůdci (hmyzem nebo hlodavci), plísněmi a pleveli. Avšak jejím použitím může dojít k zamoření přírodní oblasti, kontaminaci pěstovaných plodin a následně k ohrožení živých organismů.

Jedovaté látky ohrožují živý organismus při nízkých koncentracích či dávkách, při podání jednorázovém nebo opakovaném a mohou zapříčinit vážné poškození až jeho smrt. Může se jednat například o otravu těžkými kovy (rtuť, kadmium), rozpouštědly (methanol, ethanol) nebo toxiny živočišného, rostlinného (ricin) či mikrobiálního (botulotoxin) původu.

Za drogu lze považovat látku s narkotickým účinkem. Nejvýznamnějšími druhy jsou kanabisového (hašiš, marihuana), opiátového (morfin, heroin), stimulačního (kokain, pervitin, extáze) a halucinogenního (LSD, meskalin) typu. Původní léky morfin a amfetamin jsou zneužívány jako drogy. Z amfetaminu se dále vyrábí metamfetamin (pervitin) [19].

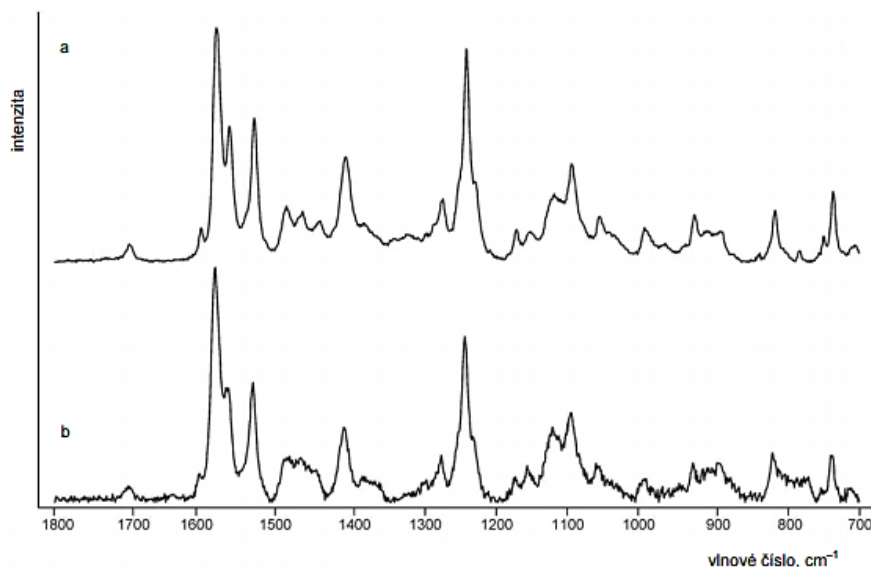
3. ANALÝZA BIOLOGICKY AKTIVNÍCH LÁTEK POMOCÍ RAMANOVY SPEKTROMETRIE

3.1 ANALÝZA FALEŠNÝCH LÉKŮ – ANTIMALARIKA, VIAGRA

Obecně lze lék popsat jako produkt vyrobený z léčiv a farmaceutických pomocných materiálů specifickým technologickým postupem a to s cílem, aby se biologický účinek léčiva mohl podat živému organismu. Výrobce originálních léčiv dodržuje předpisy GMP (Good Manufacture Practice), díky kterým poskytuje zaručené informace o složení, účincích a procesu zabezpečení kvality léku. Tyto informace při výrobě falešných léků nejsou známy. Falzifikáty mohou obsahovat vysoké nebo naopak nízké hodnoty léčivé látky nebo různé nebezpečné příměsi, díky kterým je lék ve větším množství nebo zlevňuje výrobní proces. Velmi často se jedná o léky upravující hladiny cholesterolu, na hubnutí, na spaní, na snížení krevního tlaku, na zvýšení erekce, dále na léčbu AIDS, tuberkulózy, malárie a různé potravinové doplňky. Pro rozpoznání originálního léku od falešného se používají chemické analýzy, kterými lze bezpečně rozeznat chemické složení léku, koncentrace jednotlivých složek i přítomnost možných nečistot.

V rozvojových zemích jsou padělány hlavně léky na léčbu malárie, AIDS a tuberkulózy. Antimalarika jsou deriváty artemisinu (ARTs skupina). Do této skupiny léků patří arteter, artemeter (AM), artesunát (AS) a dihydroartemisin (DHA). Metodou RS je možné velmi rychle identifikovat jednotlivé léčivé i nežádoucí složky, jejich koncentrace a potvrdit tak pravost léků. Nechtěnými složkami antimalarik jsou například erytromycin nebo paracetamol.

Dalším příkladem padělaného léku je Viagra s účinnou látkou sildenafil (obr. 10). Většinou jsou originální i padělané tablety léku vizuálně stejné. Jiná je ovšem chemická analýza padělku, která vytvoří odlišné spektrum. RS měří nejen povrch tablety, ale i jednotlivé vrstvy do 3 - 7 mm od dopadu záření na její povrch. Získaná spektra jsou porovnávána s identifikační databází od výrobce [20].



Obr. 10 Ramanovo spektrum sildenafilu (a) a originální tablety Viagry (b); ($700 - 1800\text{cm}^{-1}$, $\lambda_{\text{exc}} = 785 \text{ nm}$), převzato z [20]

3.2 KONTROLA KVALITY ŠUMIVÝCH LÉČIV

Šumivá léčiva, která se používají zejména při nachlazení, obsahují aktivní farmaceutické látky (API) a nejčastěji směsi látek pomocných. Je použit přenosný Ramanův spektrometr s technikou ORS (Orbital-Raster-Scan), který je vybaven skenem pro měření větší plochy vzorku oproti disperzním Ramanovým spektrometrům, které využívají pevně mířený laser na jeden bod povrchu vzorku, a proto je nutné naměřit 15 spekter pro dostatečně reprezentativní analýzu.

Kontrolní analýza pomocí mobilního Ramanova spektrometru s technikou ORS (obr. 11) se zabývá identifikací a kvantifikací látek přítomných v tabletě a hlavně koncentrací aktivních látek, které musí být v přesném poměru. Šumivé tablety neprocházejí před měřením žádnou úpravou vzorku, ale lze je změřit i rozpuštěné v roztoku. Ramanův spektrometr s technikou ORS naskenuje plochu povrchu o velikosti 3 mm velmi rychle, nedestruktivně, spolehlivě a bez jakéhokoliv snížení spektrálního rozlišení.

Výsledkem analýzy je jedno spektrum, které podává informace o jednotlivých složkách a jejich koncentracích stejně jako 15 spekter při měření RS bez techniky ORS [21].



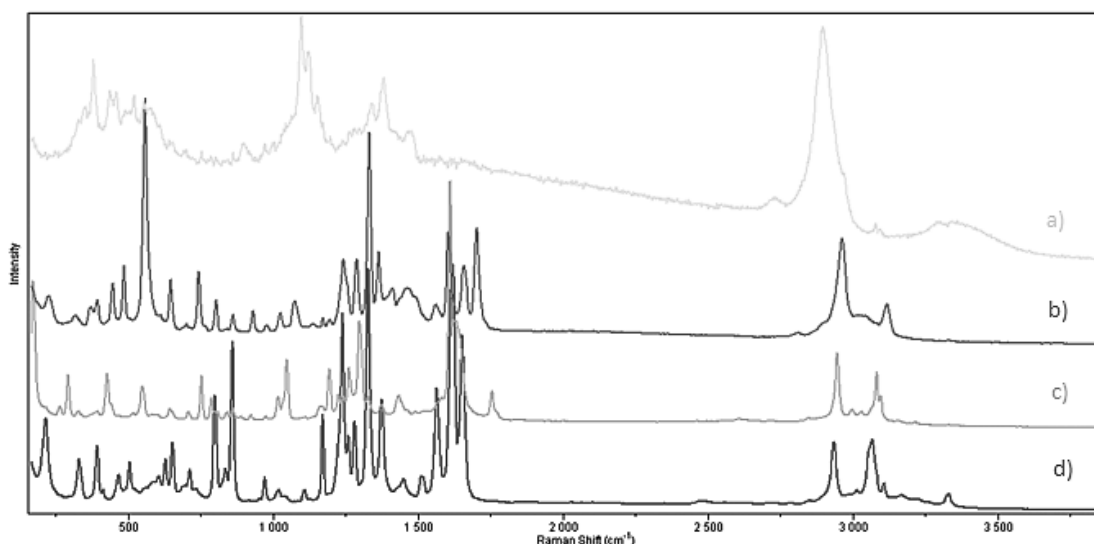
Obr. 11 Mobilní Ramanův spektrometr Metrohm Mira, převzato z [21]

3.3 MAPOVÁNÍ TABLETY ASPIRINU

Mapování farmak probíhá za pomoci Ramanova přístroje ve spojení se světelným mikroskopem. Nespornou výhodou Ramanovy mikrospektrometrie je, že dokáže analyzovat velmi malé částice ve velmi malém množství materiálu, jako jsou například jednotlivá zrna nebo krystaly, a mapovat jejich rozmístění ve vzorku, na kterém může záležet rozpustnost a účinnost léku. Prostorové rozlišení složek v Ramanově spektru je mnohem kvalitnější než ve spektru infračerveném. Rozměr zmapované zóny může sahát od celé tablety až po malou plochu několika zrn či krystalů.

Zmapovaná tableta aspirinu obsahuje tři aktivní látky – kyselinu acetylsalicylovou, paracetamol, kofein a dále jednu látku pomocnou – celulózu (obr. 12). Tyto čtyři látky jsou viditelné na třech vytvořených mapách, ale ne všechny látky současně. První mapa celé tablety obsahuje 50 901 zobrazovacích bodů plochy $7 \times 18 \text{ mm}^2$ a jsou na ní vidět tři aktivní látky. Další mapa s větším rozlišením zobrazuje i čtvrtou složku – celulózu, kterou obsahuje celá tableta, ale jen v malých rozmístěných oblastech.

Poslední mapa obsahuje 90 601 zobrazovacích bodů a lze na ní pozorovat tvar a velikost jednotlivých zrn celulózy a samozřejmě také spektra všech čtyř látek. V současnosti je možné zmapovat vzorek během několika minut či hodin oproti dřívějším několika dnům nebo týdnům. Výsledná spektra jsou porovnána s knihovnou Ramanových spekter [22].



Obř. 12 Ramanova spektra jednotlivých složek tablety Aspirinu: celulóza (a), kyselina acetylsalicylová (b), paracetamol (c) a kofein (d), převzato z [22]

3.4 STANOVENÍ OBSAHU MLÉČNÉHO TUKU

Mléko je svým složením velice důležitý zdroj živin a zabezpečuje přísun nezbytných nutričních látek pro zdravý vývoj novorozence. Mateřské mléko obsahuje cenné minerální látky, nenasycené mastné kyseliny pro výstavbu buněčných membrán a protilátek na posílení imunity. V dospělosti je nejvíce konzumováno mléko kravské s 3,5 – 5% tuku a mléčné výrobky z něj vyrobené. Skládá se z mastných kyselin, triacylglycerolů, karotenoidů (hlavně beta-karotenu), vitaminů A, D, E, K rozpustných v tucích a aromatických sloučenin, které přispívají k vůni a chuti mléka. Kvalita mléka se určuje podle obsahu bílkovin, tuku a sacharidů.

Obsah mléčného tuku lze měřit gravimetrickým stanovením podle Röse – Gottlieba, acidobutyrometrickým stanovením podle Gerbera, turbidimetrickou metodou, infračervenou spektroskopií a Ramanovou spektrometrií. Za referenční metodu se považuje gravimetrické stanovení podle Röse – Gottlieba a doplňující metodu je acidobutyrometrické stanovení podle Gerbera. Ramanova spektrometrie není ke stanovení obsahu mléčného tuku standardně využívána, ale ve vodném prostředí vykazuje slabý rozptyl, proto RS lze pro stanovení použít.

Ramanův rozptyl odpovídá „otiskům prstů“ vibrací určitých molekul, a tak lze získat spektra pásů, která odpovídají identifikačním pásům tuků, bílkovin a sacharidů.

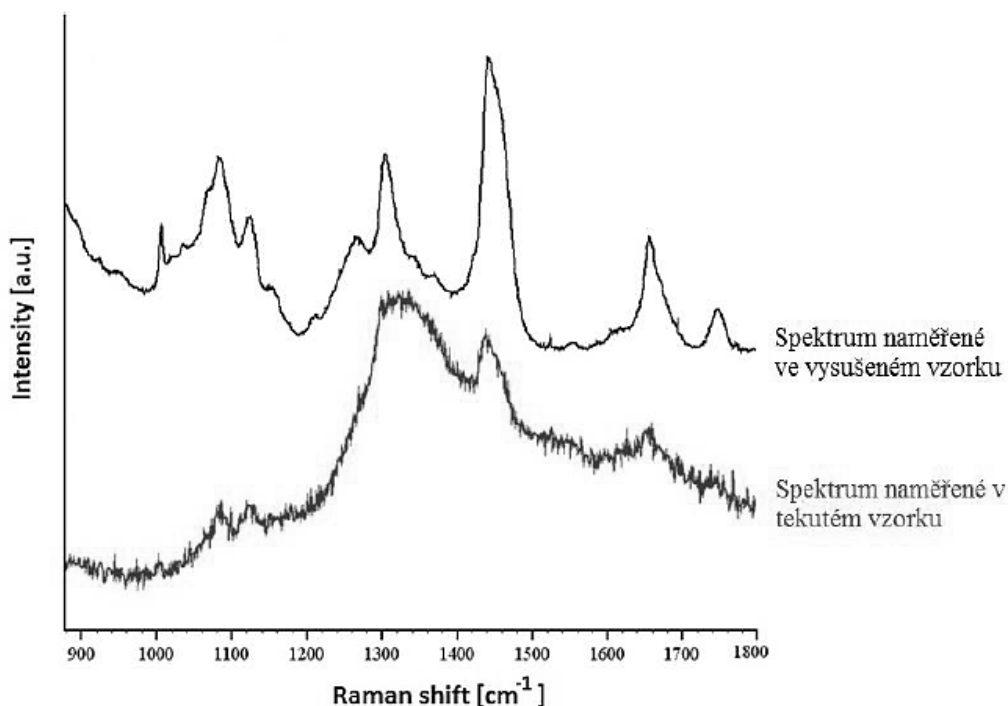
Obaly tukových kuliček jsou tvořeny lipidy a bílkovinami, takže se může stát, že se bílkovinné a lipidové pásy mohou překrývat. Charakteristické pásy odpovídající bílkovinám, které jsou tvořené amidovými skupinami, lze rozeznat podle chemických vazeb a typické pásy lipidů vznikající za přítomnosti uhlovodíkových řetězců.

Při stanovení mléčného tuku jsou viditelné výrazné píky. Například pík o vlnočtu 1650 cm^{-1} odpovídající kyselině olejové, která tvoří 29% mléčného tuku. Dále pík s vlnočtem 1440 cm^{-1} , který lze přiřadit kyselině stearové, palmitové či olejové a také pík u vrcholu 1747 cm^{-1} určující esterovou vazbu, která je součástí triacylglycerolů.

Mléčný tuk je stanoven v odtučněném (0,5% tuku), polotučném (1,5%) a plnotučném (3,5%) mléku. Připravuje se řada pěti vzorků s rostoucím obsahem tuku o 0,5% po smíchání všech druhů mlék. Referenční metodou lze zjistit, že obsah tuku v prvním vzorku místo 0,5% je pouze 0,1% a ve druhém vzorku místo 1% je skutečný obsah 0,8%. Ostatní koncentrace jsou stejné.

Pro stanovení mléčného tuku metodou RS je použit Ramanův spektrometr Renishaw in Via Basis s mikroskopem Leica a s připojeným počítačem se softwarem WIRE 3.0. Vzorky jsou umístěny na hliníkovou destičku a vkládány pod objektiv mikroskopu. Nejdříve je nutné najít optimální podmínky pro měření (výběr a výkon laseru, čas expozice, zvětšení objektivu a počet akumulace), aby mohla vzniknout dobře čitelná spektra (poměr signálu a šumu, bez překrytí fluorescence). Měření probíhá s diodovým laserem o plném výkonu, který měří v blízké infračervené oblasti 785 nm , s 50x násobným zvětšením objektivu a ve spektrálním rozsahu $300 - 1800\text{ cm}^{-1}$.

Všechny vzorky jsou měřeny bez úprav v tekuté formě. U vzniklých spekter ale není možné píky odečíst, protože spektra jsou nečitelná, při měření vznikala fluorescence a to vedlo ke vzniku výrazného šumu. Vzorek s 0,1% tuku je dále měřen jako vysušená kapka (obr. 13). Sušení vzorků probíhá při laboratorní teplotě do druhého dne. Výsledné spektrum je zřetelně vymezeno a pak je možné píky odečíst. Proto jsou dále vzorky měřeny ve vysušené formě. Podmínky při měření všech vzorků se nemění. Výrazný šum u měření tekutých vzorků byl nejspíše způsoben přítomnou vodou ve vzorcích, avšak voda by vznik spektra neměla takto ovlivňovat díky svému slabému Ramanovu rozptylu.



Obr. 13 Spektrum mléka s koncentrací mléčného tuku 3,5%, převzato z [23]

Po odečtení dominantních píků identifikujících mléčný tuk jsou vyhodnocena výsledná spektra pomocí normování. Intenzita bodů ve spektru je vztažena na fenylalaninový pík s vlnočtem 1006 cm^{-1} a tím je získána relativní intenzita, která je poté zaznamenána do grafu v závislosti na naměřené tučnosti pomocí referenční metody. Vznikne přímka lineární regrese rovnice přímky a korelační koeficienty.

Kontrola obsahu mléčného tuku v mléce nebo v mléčných výrobcích pomocí RS je možná jen v případě, pokud mléko pochází jen z jednoho zdroje a obsah bílkovin se mění jen minimálně. Stanovení mléčného tuku Ramanovou spektrometrií je rychlé a bez nutnosti složité přípravy vzorku. Avšak pro měření s RS je nutné zachovat i referenční metodu pro kalibraci a případné ověření výsledků analýzy [23].

3.5 STANOVENÍ METHANOLU

Methanol je bezbarvý, těkavý a silně jedovatý jednosytný alkohol, který lze mísit s vodou a ethanolem. Používá se v chemickém průmyslu jako rozpouštědlo, přidává se do nemrznoucích směsí, organických látek a pohonných hmot. Jeho toxické metabolity

formaldehyd a kyselina mravenčí utlumují centrální nervovou soustavu, poškozují sítnici a mohou tak způsobit trvalou slepotu.

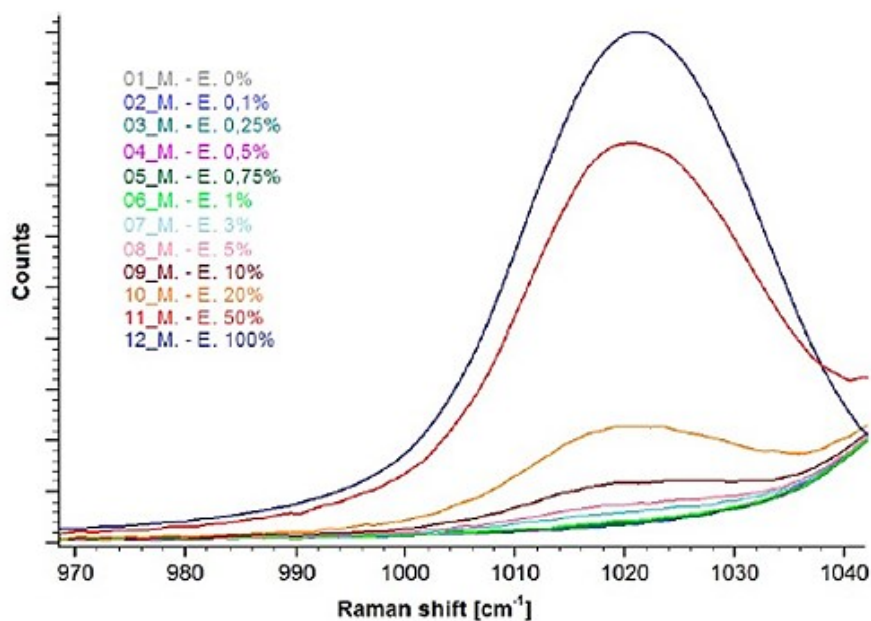
Před měřením kalibrační řady vzorků jsou měřeny čisté alkoholy – methanol a ethanol. Spektrum čistého methanolu vykazuje šest vlnočtů dominantních píků a také spektrum čistého ethanolu vykazuje osm vlnočtů charakteristických píků.

Je připraveno 12 vzorků s obsahem methanolu (v koncentracích 0; 0,1; 0,25; 0,5; 0,75; 1; 3; 5; 10; 20; 50 a 100%) a ethanolu, které dohromady tvoří 40% alkohol v celkovém obsahu, který je 4 ml. Zbýlých 60% je vždy destilovaná voda. Analyzovány jsou skleněné vialky s roztoky na Ramanovo spektrometru Renishaw in Via Basis s vybraným diodovým laserem v plném výkonu, který měří v blízké infračervené oblasti při 785 nm vlnové délky a objektivem 5x násobně zvětšeným. Pro vyšší účelnost je Ramanovo spektrum rozděleno na dvě části, takže vzorky jsou změřeny v oblasti vlnočtu 1350 cm^{-1} a při 2900 cm^{-1} .

Kalibrační křivky jsou sestaveny pro oblast vlnočtu 1350 cm^{-1} a 2900 cm^{-1} a to podle závislosti intenzity Ramanova záření na koncentraci měřené látky a závislosti plochy pod píkem na koncentraci měřené látky. Ramanova spektra jsou upravena a hodnoty ze spekter jsou odečteny v programu WireTM. V první oblasti vlnočtu 1350 cm^{-1} je nejvíce výrazný pík 1021 cm^{-1} , u kterého jsou viditelné změny intenzity závislé na koncentraci měřených vzorků (obr. 14). V druhé oblasti dominuje pík s vrcholem 2845 cm^{-1} , u kterého jsou také vidět změny všech analyzovaných vzorků podle jejich koncentrace. Změřenou intenzitu Ramanova záření odečte program WireTM pro všechny analyzované vzorky.

V programu Microsoft Excel jsou sestaveny kalibrační křivky podle závislosti intenzity Ramanova záření na koncentraci methanolu v roztoku a dále jsou programem vypočteny lineární regrese s hodnotami spolehlivosti. Díky lineární regresi lze vypočítat jednotlivé koncentrace a z hodnot spolehlivosti lze zjistit přesnost kalibrační křivky.

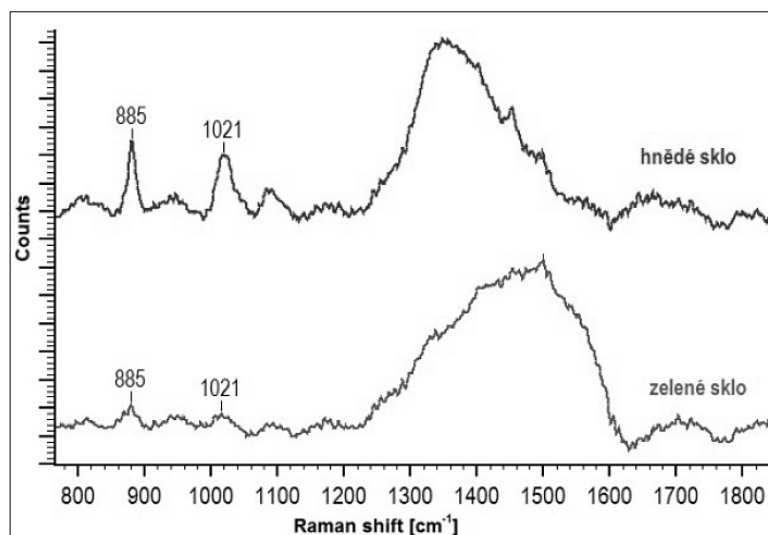
Přesnější výsledky jsou zjištěny z první měřené oblasti v závislosti intenzity Ramanova záření na koncentraci methanolu v roztoku methanol-ethanol-voda. Takovýmto způsobem lze provést kvantitativní analýzu lihovin na neznámý obsah methanolu.



Obr. 14 Detail na klíčovou oblast – 1021 cm^{-1} , převzato z [24]

Dále je analyzován vliv lahve v čiré, zelené a hnědé barvě skla na výsledek měření. Pro tuto analýzu je namícháno 25 ml roztoku methanolu, ethanolu a destilované vody. Celkový objem roztoku je tvořen 40% methanolem a ethanolom v poměru 1:1 a 60% destilované vody. Pomocí funkcí programu WireTM je měřen povrch čiré lahvičky po 0,5 mm až do 4,5 mm pod jejím povrchem. Takto je naměřeno 10 spekter a také je provedena hloubková analýza. Ve spektru i hloubkové analýze jsou výrazné pásy při vrcholu 1250 cm^{-1} až do 1600 cm^{-1} vlnočtu. V této oblasti je při hlubším měření intenzita Ramanova záření snížena a naopak je zvýšena intenzita spekter měřeného roztoku v lahvičce a naopak při měření 0,5 mm pod povrchem je pozorována intenzita měřeného roztoku nižší a vyšší vliv skleněného obalu. Při hlubším průniku laserového paprsku do analyzovaného roztoku je vliv skleněné lahve minimalizován.

Podle obdobného principu je provedena i analýza zeleného a hnědého skla. Avšak při porovnání výsledného spektra měření se zelenou a hnědou lahvičkou lze vidět výrazné rozdíly velikosti píků. Ve spektru získaném z měření hnědé lahvičky jsou vidět výrazné pásy methanolu a ethanolu, ale ve spektru z měření zeleného skla je intenzita methanolu a ethanolu velmi snížena a píky nejsou dostatečně zřetelné (obr. 15).



Obr. 15 Srovnání spekter lahviček obsahující vzorek, převzato z [24]

Podle provedených analýz lze zhodnotit čirou láhev o tloušťce 3 mm jako obal, který podstatně neovlivňuje výsledná spektra měření roztoku (methanol-ethanol-voda) a ve výsledném spektru jsou vidět charakteristické píky methanolu a ethanolu. Podle měření roztoku v barevném skle je zřejmé, že výsledná spektra jsou ovlivněna skleněným obalem a to hlavně při analýze zeleného skla. Na základě výsledků je možné doporučit analyzovat lihoviny a roztoky o neznámých koncentracích alkoholů v čírem skle nebo například ve vialce [24].

3.6 IDENTIFIKACE KOKAINU V TEXTILIÍCH

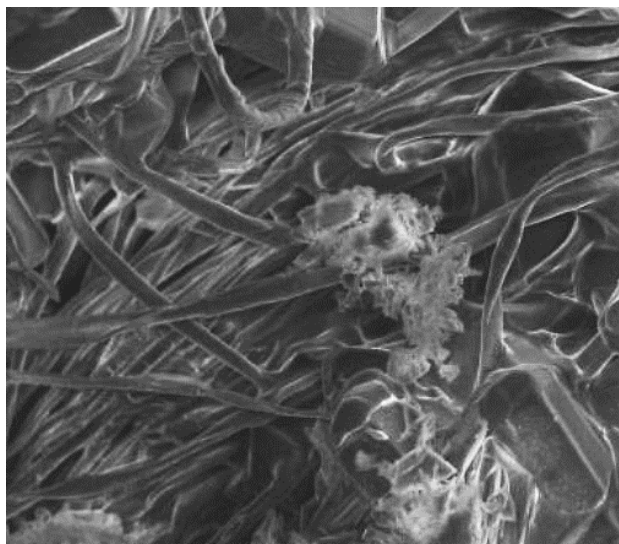
Drogy pocházejí z přírodních zdrojů nebo jsou vyráběné synteticky z hub, rostlin či původních léčiv. Mají stimulační účinky na psychiku, vyvolávají pocit euforie, někdy i útlum organismu a vznik halucinací. Některé drogy potlačují pocit únavy nebo vyčerpání. Tyto látky jsou obecně popsány a rozděleny v kapitole 2.3. Lidé požívající drogy si tak mohou vytvořit závislost na narkoticích. Životu nebezpečné je hlavně kombinování různých druhů drog dohromady [19; 25].

Pro analýzy drog jsou aplikovány instrumentální metody, jako je chromatografie, spektroskopické metody a hmotnostní spektrometrie. Pro okamžité stanovení drogy v terénu jsou k dispozici přenosné Ramanovy spektrometry, které využívají hlavně bezpečnostní složky.

Výhodou RS oproti výše zmíněným metodám je, že není nutná žádná úprava vzorku před analýzou. Lze měřit drogy čisté i ve směsi, rozpuštěné ve vodných roztocích s alkoholy či ve zvlhlých materiálech, přes skleněný obal nebo několik vrstev průhledné folie a to během několika sekund.

Kokain lze pašovat mnoha způsoby například v roztocích, ve vosku, konzervách, bambusových holích, proutěných košících, knižních vazbách a napuštěné v textiliích. Tato droga je po úpravě vzorku detekována v laboratorních podmínkách pomocí plynové chromatografie samotné nebo ve spojení s hmotnostní spektrometrií a FTIR spektrometry ve spojení s ATR technikou, ale zmíněnými metodami následně dochází k destrukci vzorku.

Je připraven roztok 450 mg hydrochloridu kokainu rozpuštěného ve směsi 1 ml ethanolu a vody. Do připraveného roztoku jsou naloženy vzorky přírodní i umělé textilie o velikosti 0,5 cm a takto jsou ponechány přes noc. Analýza je provedena třemi druhy Ramanových spektrometrů (přenosný Ramanův spektrometr *Delta Nu*, Přenosný RIAS a Ramanův spektrometr Renishaw in Via Reflex). Vysušené vzorky textilií jsou nafoceny a zaznamenány na elektronové mikrofotografii, na které lze vidět vlákna textilie a krystalické struktury hydrochloridu kokainu (obr. 16).



Obr. 16 Pořízená mikrofotografie, kde jsou vidět vlákna džínoviny a krystaly hydrochloridu kokainu, převzato z [25]

Identifikace v nebarvených textiliích

Identifikace hydrochloridu kokainu v nebarvené bavlněné i syntetické (polyesterové) textilií je uskutečněna na třech typech Ramanovo spektrometrů. Vzniklá tři Ramanova spektra jsou vzájemně porovnána a jsou na nich vidět čtyři pásy nepochybně určující hydrochlorid kokainu. První pás v oblasti vlnočtu 1711 cm^{-1} charakterizuje estery kyseliny benzoové, dále pás 1594 cm^{-1} odpovídá aromatickému kruhu a oblast vlnočtu 784 cm^{-1} popisuje piperidinový a pyrolidinový kruh.

Identifikace v barevných textiliích

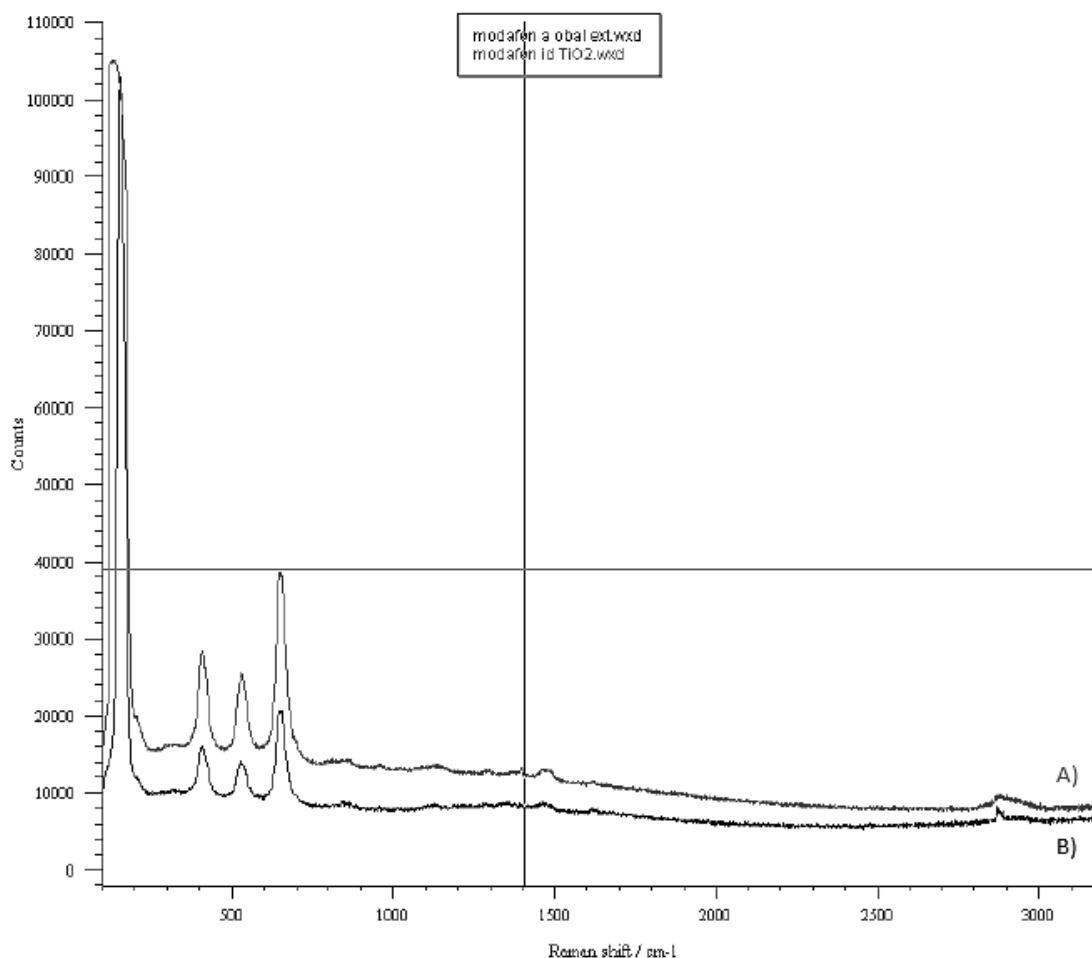
Různé pigmenty mohou fluoreskovat a maskovat tak přítomnost hydrochloridu kokainu při analýze Ramanovou spektrometrií a na výsledném spektru se nemusí jednoznačně objevit charakteristické oblasti.

Je analyzován napuštěný vzorek modré džínoviny a oranžového bavlněného trička. Po analýze barevných textilií výsledná spektra zobrazují stejné výrazné píky, kterými lze určit přítomnost této drogy. Podstatná fluorescence je vykazována vzorkem oranžového trička, avšak na výsledném spektru lze velmi dobře rozeznat dominantní píky pro nespornou přítomnost hydrochloridu kokainu [25].

3.7 IDENTIFIKACE MODAFENU PŘES OBAL

Modafen je využíván pro své antipyretické, protizánětlivé a analgetické účinky při nachlazení a akutních infekčních onemocnění horních cest dýchacích [26]. Obsahuje účinné látky ibuprofen a také pseudoefedrin, který se používá pro výrobu pervitinu.

Nejdříve je provedeno měření samotné tablety bez obalu Ramanovým spektrometrem Renishaw a výsledné Ramanovo spektrum vykazuje čtyři výrazné píky. Poté je provedeno měření samotného obalu, ale výsledné spektrum je nečitelné kvůli vzniklé fluorescenci, proto je zhotovena analýza tablet v obalu. Získané Ramanovo spektrum je takřka identické se spektrem měřených tablet bez obalu. Drobné rozdíly lze pozorovat v oblasti vlnočtu $800 - 1000\text{ cm}^{-1}$ (obr. 17). Přes čirý obal lze celkem detailně zaměřit povrch tablety. Na povrchu tablety jsou měřena tři místa, na kterých lze pozorovat jiné koncentrace obsahujících látek, ale výsledná spektra těchto míst jsou shodná [25].

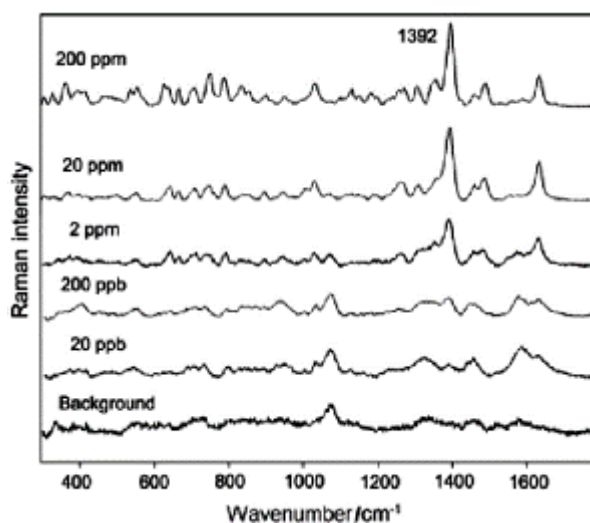


Obř. 17 Identifikace Modafenu přes obal (porovnání dvou spekter), spektrum tablety bez obalu (a) a spektrum tablety v obalu (b), převzato z [25]

3.8 IDENTIFIKACE ANTIBIOTIK POMOCÍ SERS

Antibiotika jsou léky, které zneškodňují mikroorganismy a jsou běžně využívány pro léčbu infekčních onemocnění. Podle účinku se dělí na bakteriostatické, která zpomalují množení bakterií nebo baktericidní, která bakterie usmrcují. Dále lze tyto léky rozdělit podle chemického složení do několika kategorií. Při hojném používání antibiotik se může stát, že živý organismus často léčený ATB se stane rezistentní na účinky těchto léků nebo mikroorganismy, které se již setkaly s konkrétním antibiotikem, se stanou vůči účinné látce léku rezistentní [27]. Na území USA jsou antibiotika často přidávána do krmiv drůbeže. Nejčastějšími potravinami na trhu v České republice, u kterých lze najít antibiotická rezidua je víno a med. Z pohledu dlouhodobé konzumace mohou zakázané látky v potravinách způsobovat zdravotní problémy [28] nebo způsobit vznik antibakteriální rezistence na tyto látky.

Antibiotická rezidua lze identifikovat a stanovit pomocí povrchem zesílené Ramanovy spektrometrie (SERS). Je provedena analýza tří antibiotik – ciprofloxacinu, enrofloxacinu a chloramfenikolu na upraveném povrchu nanočásticemi stříbra, které vznikají reakcí AgNO_3 a zinku. Dále je použit laser měřící v blízké infračervené oblasti vlnové délky 785 nm. Na zdrsňelý povrch je aplikován vzorek, který absorbuje laserové záření od 400 do 800 nm vlnové délky. U spektra ciprofloxacinu je výrazný pík o vlnočtu 1392 cm^{-1} . Výsledné spektrum vzniká závislostí Ramanova signálu na koncentraci při určitém vlnočtu (obr. 18) [29].



Obr. 18 Povrchem zesílená Ramanova (SERS) spektra různě koncentrovaného ciprofloxacinu (20 – 200 ppm), převzato z [29]

3.9 IDENTIFIKACE A DISTRIBUCE SLOŽEK HYPOLIPIDEMIK

Hypolipidemika jsou léky, které snižují hodnoty plazmatických lipidů ve formě lipoproteinů. LP se rozdělují do pěti typů podle zastoupení bílkovin, lipidů (triacylglycerolů, cholesterolu a fosfolipidů) a druhu apoproteinu. Lipoprotein LDL s nízkou denzitou, který se skládá z více jak 70% cholesterolu, ve zvýšené koncentraci nad $3,0 \text{ mmol/l}$ přispívá ke vzniku zdravotních problémů zejména aterosklerózy s následnou ischemií nebo infarktem myokardu. Zároveň je důležité udržovat lipoprotein HDL s vysokou denzitou v hodnotách vyšší jak $1,0 \text{ mmol/l}$. Tento LP je složen z 45% bílkovin a 55% lipidů. Hypolipidemika lze rozdělit do několika skupin aktivních látek – statiny, fibráty, kyselina nikotinová, pryskyřice a ostatní nezařazená hypolipidemika [18; 30].

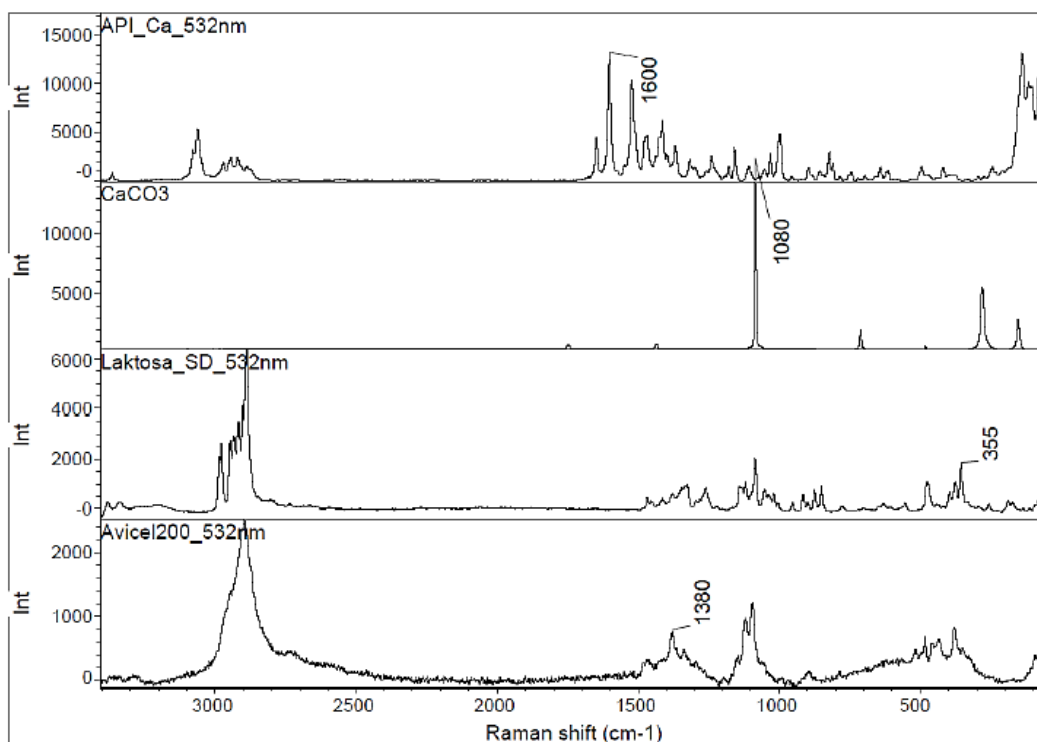
Statiny se používají při léčbě hypercholesterolemie (i při familiárním výskytu) a nesmí je užívat ženy v těhotenství a v době kojení. Terapie léky obsahující statiny vede ke snížení LDL a následně ke snížení cholesterolu v krvi. Ze skupiny statinů je nejvíce využíván lovastatin, simvastatin, pravastatin, fluvastatin a atorvastatin. Léky na snížení cholesterolu v krvi se skládají také z pomocných látek, které dávají konečnému léku určité vlastnosti, stabilitu a lékovou formu. Jsou to látky (rozpouštěcí látky, plnidla, pojivové látky) či směsi látek nezbytné pro zpracování léčiv a zhotovení výsledného léku.

Pomocí RS lze zkoumat změnu struktury látky při úpravě léčiva (sušení, granulování či lisování) a i případný vznik polymorfismu (vznik více krystalických forem). Některé látky mají více polymorfních forem a každá tato forma se ve spektru vyskytuje při jiném vlnočtu.

Nejdříve je tableta vzorku A (generický lék) i vzorku B (originální lék) zalita do parafínu a následně seříznuta mikrotomem, díky kterému lze zabránit vzniku nerovného, hrbolatého povrchu. Pro analýzu je použit disperzní Ramanův mikroskop Nicolet DXR s objektivy 10x 0,25 N.A. a 50x 0,75 N.A., laserem o výkonu 10 mW a měřicím v oblasti 532 nm vlnové délky, CCD detektorem a programem Omnic, který umožňuje mapování vzorků, vyhodnocuje vzniklé mapy a upravuje případnou vznikající fluorescenci při analýze. Objektiv s 50x násobným zvětšením je aplikován při mapování řezu tablety a pro analýzu jednotlivých složek tablety je využit objektiv s 10x násobným zvětšením.

Ke zhodnocení výsledných map je využita jednorozměrná analýza. Dále jsou naměřena spektra (obr. 19) jednotlivých složek vzorku A, B a také distribuční mapy těchto látek. Modrá barva v distribuční mapě značí nízký Ramanův signál a červená barva označuje vysoký Ramanův signál. Paprsek Ramanova mikroskopu je schopen zaměřit na část mapy menší než 1 μm , a proto lze zjistit detailnější informace o rozložení látek ve vzorku. Hodnocení map Ramanovo mikroskopem je sice velice detailní, ale měření trvá mnohem déle než při použití infračervené spektroskopie. Při porovnání zhodnocených ploch oběma metodami dokáže RS zhodnotit jen část mapy zhodnocené infračervenou spektroskopií.

Aktivní farmaceutická složka (API) není zde konkrétně jmenována kvůli zachování obchodního tajemství společnosti Zentiva.



Obr. 19 Ramanova spektra čistých složek vzorku A s vyznačením charakteristických pasů. Spektrum API s char. pasem při 1600 cm^{-1} , uhličitanu vápenatého s char. pasem při 1080 cm^{-1} , laktózy s char. pasem při 355 cm^{-1} a Avicelu (celulózy) s char. pasem při 1380 cm^{-1} , převzato z [30]

Z distribučních map lze také zjistit informace o výrobě měřených vzorků. Protože u vzorku A je API obklopena všemi látkami vyskytujícími se v tabletě, lze z toho vyvodit, že všechny čtyři složky jsou nejdříve smíseny do vzniku granulátů a až poté lisovány do tablet. U vzorku B je zjištěno, že výroba probíhá stejně jako u vzorku A, akorát jsou zde odlišné rozměry granulátů před lisováním do tablet.

Touto analýzou pomocí Ramanova mikroskopu lze identifikovat jednotlivé složky tablety a změřit jejich spektrum, určit distribuci a velikost částic těchto složek velmi podrobně a zjistit informace o výrobě analyzovaných tablet [30].

Tab. 1 Přehled analyzovaných biologicky aktivních látek pomocí RS, 1. část

Analyzovaná BAL	Použitá technika RS	Výsledky analýzy	Výhody analýzy	Nevýhody analýzy	Zdroj
Antimalarika, Viagra	Ramanův spektrometr	<ul style="list-style-type: none"> ○ Identifikace všech složek včetně nečistot ve vzorku ○ Určení jejich koncentrace ○ Potvrzení pravosti léků 	<ul style="list-style-type: none"> ○ Standardně používaná metoda pro analýzu Viagry a dalších léků ○ Bez úprav vzorků 		[20]
Šumivá léčiva	Přenosný Ramanův spektrometr s technikou ORS	<ul style="list-style-type: none"> ○ Kvalitativní, kvantitativní informace ○ Rychlá analýza ○ Lze měřit vzorky bez úprav i rozpuštěné 	<ul style="list-style-type: none"> ○ Měření větší plochy vzorku pomocí skenu ○ Měření v terénu ○ Bez úprav vzorku 		[21]
Aspirin	Ramanův spektrometr a světelný mikroskop	<ul style="list-style-type: none"> ○ Analýza malých částic v malém množství vzorku ○ Distribuce složek ve směsi ○ Mapování jednotlivých zrn, krystalů až po celou tabletu 	<ul style="list-style-type: none"> ○ Lepší prostorové rozlišení složek ve spektru než u infračervené spektroskopie ○ Bez úprav vzorku 		[22]
Mléčný tuk	Ramanův spektrometr Renishaw in Via Basis, mikroskop Leica a software WIRE 3.0	<ul style="list-style-type: none"> ○ Kvantitativní analýza mléčného tuku v % ○ Možná detekce i kvantifikace ostatních složek vzorku ○ Vznik grafu závislosti intenzity Ramanova signálu na naměřené tučnosti 		<ul style="list-style-type: none"> ○ Vznik výrazné fluorescence pravděpodobně kvůli vodě obsažené ve vzorku ○ Nutná úprava vzorku do vysušené formy pro vznik čitelných spekter 	[23]

Tab. 2 Přehled analyzovaných biologicky aktivních látek pomocí RS, 2. část

Analyzovaná BAL	Použitá technika RS	Výsledky analýzy	Výhody Analýzy	Nevýhody analýzy	Zdroj
Methanol	Ramanův spektrometr Renishaw in Via Basis a světelný mikroskop	<ul style="list-style-type: none"> ○ Kvantitativní i kvalitativní analýza lihovin ○ Měření vlivu obalu při analýze ○ Měření povrchu i hloubková analýza roztoku přes obal 	<ul style="list-style-type: none"> ○ Lze měřit i přes obal ○ Čirá lahev nemá vliv na výsledné spektrum analyzované látky 	<ul style="list-style-type: none"> ○ Příprava vzorků ○ Vliv skleněného obalu v hnědé a zelené barvě na výsledná spektra 	[24]
Kokain	<ul style="list-style-type: none"> ○ Přenosný Ramanův spektrometr <i>Delta Nu</i> ○ Přenosný <i>RIAS</i> ○ Ramanův spektrometr Renishaw in Via Reflex 	<ul style="list-style-type: none"> ○ Detekce i kvantifikace drogy ○ Detekce krystalických struktur na vláknech nebarvených i barvených textilií 	<ul style="list-style-type: none"> ○ Lze měřit vzorky čisté i ve směsi, rozpuštěné, skryté v různých materiálech ○ Čitelná spektra nebarvených i barvených vzorků 	<ul style="list-style-type: none"> ○ Vznik fluorescence při analýze na barevné textilií 	[19; 25]
Modafen	Ramanův spektrometr Renishaw	<ul style="list-style-type: none"> ○ Měření vlivu obalu na výsledné spektrum analyzované látky 	<ul style="list-style-type: none"> ○ Detailní zaostření povrchu tablety přes čirý obal ○ Minimální vliv obalu na výsledné spektrum 	<ul style="list-style-type: none"> ○ Rozdíl v oblasti vlnočtu 800 – 1000 cm^{-1} 	[25; 26]
Antibiotika (ciprofloxacin, enrofloxacinu, chloramfenikol)	Povrchem zesílená Ramanova spektrometrie (SERS)	<ul style="list-style-type: none"> ○ Identifikace, stanovení antibiotik a jejich reziduí 	<ul style="list-style-type: none"> ○ Stříbrné částice potlačují vznik fluorescence a zesilují Ramanův signál 	<ul style="list-style-type: none"> ○ Nečitelné spektrum ciprofloxacinu o velmi nízké koncentraci 0,2 a 0,02 ppm 	[27; 28; 29]
Hypolipidemika	Disperzní Ramanův mikroskop Nicolet DXR s programem Omnic	<ul style="list-style-type: none"> ○ Lze zjistit informace o polymorfismu, způsobu výroby vzorků ○ Vznik a hodnocení distribučních map složek 	<ul style="list-style-type: none"> ○ Umožňuje zjistit detailnější informace o rozložení a velikosti částic ve vzorku ○ Úprava fluorescence programem Omnic 	<ul style="list-style-type: none"> ○ Příprava vzorku ○ Delší čas hodnocení map než při použití Infračervené spektroskopie 	[18; 30]

ZÁVĚR

Cílem této bakalářské práce bylo shrnout informace o Ramanově spektrometrii, a jejím využitím především v analýze biologicky aktivních látek. Výsledkem jsou jednotlivé analýzy, které jsem popsala podle druhu biologicky aktivní látky, použité techniky Ramanovy spektrometrie a její konkrétní výhody či nevýhody.

Práce je rozdělena na tři kapitoly. První kapitola pojednává o základních pojmech a principech RS, o vzniku Ramanova spektra, instrumentaci jednotlivých technik Ramanovy spektrometrie a rozmanitém využití této metody v nejrůznějších oblastech. V další kapitole jsem se zabývala popisem biologicky aktivních látek. Nejdříve jsem se je snažila definovat, stručně popsat působení těchto látek v živém organismu a rozdělit je podle toho, zda jsou přijímané jako součást potravy nebo samostatně.

Třetí kapitola obsahuje jednotlivé analýzy biologicky aktivních látek, které jsou stěžejní pro tuto práci. Na základě těchto analýz je potvrzeno, že biologicky aktivní látky lze analyzovat metodou Ramanovy spektrometrie za vzniku spolehlivých a věrohodných výsledků.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

1. JANDERA, Pavel. *Atomová a molekulová spektroskopie se zaměřením na stopovou analýzu kontaminantů*. Vyd. 3. Pardubice: Univerzita Pardubice, 2011. ISBN 9788073953928.
2. KLOUDA, Pavel. *Moderní analytické metody*. 3., upravené vydání. Ostrava: Pavel Klouda - nakladatelství Pavko, 2016. ISBN 9788086369228.
3. NĚMCOVÁ, Irena, Petr RYCHLOVSKÝ a Ludmila ČERMÁKOVÁ. *Spektrometrické analytické metody*. 2. vyd. Praha: Karolinum, 2004. ISBN 80-246-0776-X.
4. DENDISOVÁ, Marcela, Pavel ŽVÁTORA a Pavel MATĚJKA. *Ramanova Spektrometrie* [online]. In: Praha [cit. 2017-03-06]. Dostupné z: <http://old.vscht.cz/anl/lach2/RAMAN.pdf>
5. MILDE, David. *Ramanova spektrometrie* [online]. In: Olomouc, 2012 [cit. 2017-03-06]. Dostupné z: <http://ach.upol.cz/user-files/intranet/07-im-raman-1351626045.pdf>
6. MATĚJKA, Pavel. *Techniky Ramanovy spektrometrie* [online]. In: Praha, 2010 [cit. 2017-03-06]. Dostupné z: <http://old.vscht.cz/anl/matejka/09-Raman-mikroRaman-07.pdf>
7. FERRARO, John R., Kazuo NAKAMOTO a Chris W. BROWN. *Introductory Raman spectroscopy*. Vyd. 2. Boston: Academic Press, c2003. ISBN 978-0-12-254105-6. Dostupné z: <http://www.fulviofrisone.com/attachments/article/406/introductory%20raman%20spectroscopy.pdf>
8. ČÁSLAVSKÝ, Josef a Jiří Georg Kamil ŠEVČÍK. *Analýza organických látek: učební text projektu "Příprava kurzů a učebních textů v oboru vzorkování a chemické analýzy"* : modul K02-2014. Český Těšín: 2 THETA, 2014. Analytical standards and equipment. ISBN 9788026070856.

9. KARLÍČEK, Rolf. *Analytická chemie pro farmaceuty*. 2. vyd. Praha: Univerzita Karlova, 2001. Učební texty Univerzity Karlovy v Praze. ISBN 80-246-0348-9.
10. KOPLÍK, Richard. *Infračervená a Ramanova spektroskopie* [online]. In: Praha [cit. 2017-03-14]. Dostupné z:
https://web.vscht.cz/~koplikr/7_FA_IR_Raman_2014.pdf
11. WAISSER, Karel. *Úvod do biologické aktivity organických sloučenin*. Hradec Králové: Gaudeamus, 2004. ISBN 8070415584.
12. OPLETAL, Lubomír. *Přírodní látky a jejich biologická aktivita*. Praha: Karolinum, 2010. ISBN 9788024618845.
13. MARTÍNKOVÁ, Jiřina. *Farmakologie pro studenty zdravotnických oborů*. Praha: Grada, 2007. ISBN 9788024713564.
14. LINHART, Igor. *Toxikologie: interakce škodlivých látek s živými organismy, jejich mechanismy, projevy a důsledky*. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, 2012. ISBN 9788070808061.
15. SLÍVA, Jiří a Martin VOTAVA. *Farmakologie*. Praha: Triton, 2011. Lékařské repetitorium. ISBN 9788073875008.
16. KLOUDA, Pavel. *Biochemie zblízka*. Druhé, upravené vydání. Ostrava: Pavel Klouda - nakladatelství Pavko, 2016. ISBN 9788086369204.
17. KOOLMAN, Jan a Klaus-Heinrich RÖHM. *Barevný atlas biochemie*. Praha: Grada, 2012. ISBN 9788024729770.
18. BERÁNEK, Martin a Miloš TICHÝ. *Vybrané kapitoly z klinické biochemie: pro studijní program Zdravotnická bioanalytika*. Praha: Karolinum, 2013. ISBN 978-80-246-2186-9.
19. WAISSER, Karel. *Biologicky aktivní organické látky*. Hradec Králové: Gaudeamus, 2006. ISBN 80-7041-092-2.

20. PATLEVIČ, Peter, František DORKO, Pavol ŠVORC JR., Janka VAŠKOVÁ a Ladislav VAŠKO. Falošné lieky - ako ich odhalit'? *Chemické listy*. Praha, 2013, 107(1), 37-43. ISSN 0009-2770.
21. SOUKUP, Jan. Využijte potenciálu Ramanovy spektrometrie - přenosný Ramanův spektrometr a výhody systému ORS. *Chemagazín*. Pardubice, 2015, 25(5), 28-29. ISSN 1210-7409.
22. GÁBA, Alexandr. Nový Ramanský mikroskop Horiba - XploRA™ a mapování ve farmacii. *Chemagazín*. Pardubice, 2009, 19(4), 10-11. ISSN 1210-7409.
23. PAVLÍKOVÁ, Marcela. *Stanovení obsahu tuku v mléku a v mléčných výrobcích s využitím Ramanovy spektroskopie*. Zlín, 2016. Dostupné také z: <https://digilib.k.utb.cz/handle/10563/39330>. Diplomová práce. Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, Fakulta technologická. Vedoucí práce Martina Bučková.
24. TOMEČEK, Martin. *Měření koncentrace methanolu v alkoholických nápojích metodou vibrační spektroskopie*. Zlín, 2015. Dostupné také z: <https://digilib.k.utb.cz/handle/10563/33868?show=full>. Diplomová práce. Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, Fakulta aplikované informatiky. Vedoucí práce Hana Vašková.
25. BOR, Michal. *Aplikace Ramanovy spektroskopie pro forenzní účely*. Zlín, 2012. Dostupné také z: <http://digilib.k.utb.cz/handle/10563/19341>. Diplomová práce. Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, Fakulta aplikované informatiky. Vedoucí práce Hana Vašková.
26. Databáze léků. *Státní ústav pro kontrolu léčiv* [online]. Praha, 2010 [cit. 2017-04-26]. Dostupné z: <http://www.sukl.cz/modules/medication/detail.php?kod=0011024>
27. SCHINDLER, Jiří. *Mikrobiologie: pro studenty zdravotnických oborů*. 2., dopl. a přepr. vyd. Praha: Grada, 2014. Sestra (Grada). ISBN 978-80-247-4771-2.
28. DIVÁCKÝ, Jan. Antibiotika v potravinách, zejména v medu. PATOČKA, Jiří. *Toxicology* [online]. [cit. 2017-04-27]. Dostupné z: <http://www.toxicology.cz/modules.php?name=News&file=article&sid=852>

29. LI, Ying-Sing a Jeffrey S. CHURCH. Raman spectroscopy in the analysis of food and pharmaceutical nanomaterials. *Journal Of Food And Drug Analysis*. 2014, 22(1), 29-48. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jfda.2014.01.003>. Dostupné také z: [http://www.jfda-online.com/article/S1021-9498\(14\)00004-0/abstract](http://www.jfda-online.com/article/S1021-9498(14)00004-0/abstract)
30. PRŮCHOVÁ, Kristýna. *Vibrační Spektroskopie ve farmaceutické analýze*. Praha, 2012. Dostupné také z: <https://is.cuni.cz/webapps/zzp/detail/96492/>. Diplomová práce. Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědná fakulta. Vedoucí práce Ivan Němec.