

**UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE**

**PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA**

**KATEDRA ANALYTICKÉ CHEMIE**

**Nedestruktivní analýza a kontrola obsahové  
stejnoměrnosti pevných lékových forem**

**DIPLOMOVÁ PRÁCE**

**Klinická a toxikologická analýza**

**Praha 2006**

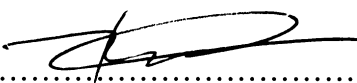
**Frýbort Ondřej**

## Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracoval samostatně, pod vedením školitele doc. RNDr. Petra Rychlovského, CSc. a konsultanta RNDr. Tomáše Grygara, CSc., a že jsem všechny použité prameny řádně citoval.

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

V Praze dne.....1.9.2006.....



.....

podpis

Děkuji všem, kteří mi při tvorbě diplomové práce pomáhali. Mému školiteli doc. Petrovi Rychlovskému za cenné připomínky. Velký dík patří konzultantovi Dr. Tomáši Grygarovi za odborné vedení, rady a dodávanou motivaci k úspěšnému dokončení této práce. Děkuji také pracovníkům Ústavu anorganické chemie AV ČR v Řeži, jmenovitě: Dr. Petru Bezdičkovi za změření vzorků RTG difraktometrem, ing. Evě Večerníkové za umožnění přístupu a práci na FT-IR spektrometru a též pomoc při interpretování spekter, Dr. Kamilu Langovi za umožnění přístupu a práci na UV-Vis spektrometru a Petrovi Vormovi za přípravu modelových směsí. Dále bych chtěl poděkovat pracovníkům firmy Zentiva, a.s., jmenovitě: ing. Tomáši Pekárkovi, ing. Jiřímu Dohnalovi a Dr. Tatjaně Grafnetterové za dodání vzorků analgetika, čistých látek a HPLC analýz . V neposlední řadě děkuji také rodičům za umožnění studia.

# Obsah

<b>1. Teoretický úvod.....</b>	<b>1</b>
1.1 Význam a provádění analýzy léčiv.....	1
1.2 Perspektivní nedestruktivní metody pro analýzu léčiv.....	7
1.2.1 Molekulová a elektronová spektroskopie.....	7
1.2.2 Analytické využití spektroskopických metod.....	11
1.2.3 RTG prášková difrakce.....	14
1.3 Stejnóměrnost dávkových jednotek.....	17
1.4 Zkoumané analgetikum ve formě nepotahovaných tablet.....	18
1.5 Cíl práce.....	21
<b>2. Experimentální část .....</b>	<b>22</b>
2.1 Chemikálie.....	22
2.2 Analytické metody.....	23
2.2.1 Difúzně reflexní UV–Vis spektroskopie (DRS).....	23
2.2.2 Konvenční UV–Vis spektroskopie roztoků.....	23
2.2.3 Infračervená spektroskopie (IR).....	24
2.2.4 RTG prášková difrakční analýza (XRD).....	24
2.2.5 Optická mikroskopie.....	25
2.2.6 Zpracování dat.....	25
<b>3. Výsledky .....</b>	<b>26</b>
3.1 Difúzně reflexní UV–Vis spektroskopie (DRS) pevného analgetika.....	26
3.2 Konvenční UV–Vis spektroskopie roztoků.....	33
3.3 IR spektroskopie.....	38
3.4 RTG prášková difrakce (XRD).....	47
3.5 Optická mikroskopie.....	59
3.6 Srovnání metod.....	61
3.6.1 Porovnání výsledků použitých metod mezi tabletami šarže 61.....	61
3.6.2 Porovnání výsledků použitých metod mezi šaržemi analgetika.....	65
<b>4. Diskuse .....</b>	<b>69</b>
4.1 Porovnání všech metod.....	69
4.2 Perspektivnost kvantitativní analýzy složení lékových forem.....	70
4.3 Perspektivy XRD.....	71
4.4 Obsahová stejnoměrnost tablet analgetika.....	72
<b>5. Závěr .....</b>	<b>73</b>
<b>6. Použitá literatura .....</b>	<b>74</b>
<b>7. Přílohy .....</b>	<b>77</b>

# 1. Teoretický úvod

## 1.1 Význam a provádění analýzy léčiv

Hlavním úkolem kontroly léčiv v praxi je zajištění jakosti a bezpečnosti léčiv tak, aby vyhovovala nejnovějším požadavkům moderní terapie [1]. Vychází především z lékopisu konkrétního státu [2]. Český lékopis obsahuje převážnou část překladů statí a článků Evropského lékopisu [3] a menší část obsahuje tzv. národní specifika. V lékopisech všech zemí je věnována značná pozornost důkazům léčiv pomocí fyzikálních konstant, chemických reakcí a fyzikálně-chemických metod a kvantitativní analýze čistých farmaceuticky aktivních složek. Nedílnými součástmi kontrolně-analytického hodnocení léčiv jsou jak jejich kvantitativní analýzy, tak zkušební metody stanovení stejnoměrnosti dávkových jednotek (hmotnostní proměnlivost a obsahová stejnoměrnost). Je překvapivé, jak málo se k identifikaci složek léčiv využívá například RTG prášková difrakce, ačkoli je to rychlá nedestruktivní analytická metoda, existují rozsáhlé databáze standardních difraktogramů četných složek a složky směsí se při měření neovlivňují [4,5,6,7,8,9,10] .

Volumetrická stanovení jsou v lékopisných monografiích nejvíce používána pro svoji cenovou dostupnost a jednoduchost provedení a současně dostatečnou přesnost a spolehlivost. Nejvíce jsou používány acidobazické titrace v nevodném prostředí. Z metod instrumentálně-analytických mají v lékopisné kvantitativní analýze dominantní postavení UV–Vis spektrometrie a vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC). Především HPLC je metodou první volby pro stanovení účinných látek v lékových přípravcích. Dalšími analytickými metodami, které se používají ke kvantitativní analýze léčiv, jsou elektroforéza, hmotnostní spektrometrie, spektrometrie v blízké infračervené oblasti a absorpční spektrofotometrie v ultrafialové a viditelné oblasti. V závislosti na použité analytické metodě je někdy nutná předchozí izolace stanovovaného léčiva z lékové formy, někdy naopak přítomnost pomocných látek, případně dalších účinných látek, stanovení neruší [2]. Mezi nejprogresivněji se rozvíjející metody farmaceutické

analýzy patří dnes RTG difrakce [10] a spektrální metody [11]. Častým motivem vývoje nových metodik je požadavek na nedestruktivní analýzu pevných vzorků, nejčastěji přímo lékových forem. Ačkoli je validace přímých metod analýzy pevných látek poměrně obtížná, lze očekávat jejich postupné zařazování mezi běžné postupy [10,11,12].

Ve výrobní fázi analytická chemie monitoruje výrobní procesy s cílem je řídit směrem k optimální výkonnosti. Převážná část racionalizačních opatření v chemické výrobě vychází dnes z analytických podkladů, protože každý zásah do výrobního procesu musí být podložen a kontrolován vhodnými analytickými metodami. Prakticky všechny vstupní suroviny a finální produkty je nutno analyticky kontrolovat. Požadované jakostní parametry jsou zakotveny v normách, nezřídka v legislativě. K dosud běžným analýzám molekulového složení v posledních letech přibývají kontroly polymorfů [4,13,14,15] a krystalových hydrátů léčiv [9], ať už z důvodu různé účinnosti nebo patentové ochrany [7]. Tyto analýzy lze provádět pouze metodami, které nevyžadují rozpouštění vzorků, tj. metody přímé analýzy pevných látek. Otázka polymorfie a solvatomorfie je ve farmacii v posledních několika letech velmi aktuální a žádný farmaceutický producent si ji nedovolí ignorovat. Snahou estetické farmaceutické firmy (originálního výrobce), která vyvinula určitou aktivní substanci, je patentově chránit všechny její možné formy. Proto zde zaujímá RTG prášková difrakce jedno z nejprestižnějších postavení na poli jednoznačného rozlišení a charakterizování všech možných forem farmaceutických substancí. Charakterizování a rozlišení forem je nutné nejenom pro stanovení fázové (polymorfní, solvatomorfní) čistoty zvolené formy při výrobě, ale také při patentových sporech originálních a generických firem [7].

Při výstupní kontrole pevných lékových forem je možný dvojitý přístup k jejich kvantitativní analýze: buď se provádí kontrola obsahu aktivní složky po jejich rozpuštění a převedení do roztoku, nebo se provádí nedestruktivní, přímá analýza pevné lékové formy, případně se léková forma jen mechanicky rozruší mletím nebo třením. Základní srovnání těchto dvou přístupů je v tabulce 1.

Kvantitativní analýza lékových forem obsahujících jednu či více farmaceuticky aktivních složek a pomocné látky se nejčastěji provádí destruktivně. Destruktivní

kvantitativní analýzou lékových forem se rozumí rozmělnění pevných lékových forem na prášek a jeho následné rozpouštění, případně extrakce [2].

**Tabulka 1:** Základní srovnání destruktivních a nedestruktivních metod kvantitativní analýzy.

Destruktivní metody		Nedestruktivní metody	
Výhody	Nevýhody	Výhody	Nevýhody
přesnost	pracnost (nutnost přípravy vzorku před měřením)	rychlost	častý vliv fyzikálních faktorů, jako je velikost částic, lisování tablet
správnost	zdlouhavost, ekonomická náročnost	ekonomická nenáročnost	typická přesnost $\geq 5\%$ , nižší spolehlivost
snadná validovatelnost pro molekulové nebo iontové látky	nutnost převedení do roztoku ztráta všech informací ohledně pevné fáze	zachování vzorku po měření získání informací o polymorfu a krystalické formě pevných látek	náročná příprava kalibračních vzorků obecně nižší reprodukovatelnost měření pevných látek

Metody přímé kvantitativní analýzy lékových forem, tj. analýzy bez jejich předběžného zpracování nebo jen po jejich mechanickém rozrušení například rozetřením, mají svá specifika daná charakterem pevné fáze. Někdy už rozetřením nebo lisováním tablet [16] dojde ke změně krystalové modifikace pevné látky nebo transformaci jejích solvátů [9,10]. V každém případě dochází ke změně velikosti částic složek a tedy ke změně odezvy většiny metod analýzy pevné fáze [9,10,11,17]. Pro zdar přímé analýzy je proto nutná dobře provedená kalibrace a pečlivá kontrola způsobu měření [9]. V současné době Český lékopis uvádí následující metody kvalitativní nedestruktivní analýzy:

- absorpční spektrofotometrii v infračervené oblasti
- spektrofotometrii v blízké infračervené oblasti

- jadernou magnetickou rezonanční spektrofotometrii
- termickou analýzu
- RTG fluoescenční spektrometrii
- hmotnostní spektrometrie
- Ramanovu spektrometrii

K optimalizaci analytických postupů je nutno přistupovat z mnoha hledisek. Nejčastěji je to hledisko optimalizace kontrolní, předem zvolené metody, sloužící například ke kontrole výroby. V tomto případě se optimalizuje použitá metoda jako celek, včetně času potřebného k získání jedné analýzy. Právě malá časová náročnost nedestruktivních měření může pomoci rozhodnout o jejím zavádění do výrobní praxe k průběžné kontrole technologie [18,19]. Metoda se však dá dále optimalizovat z hlediska přesnosti dosahovaných výsledků, z hlediska meze detekce, eventuálně i z hlediska možnosti automatického chodu celého zařízení a vyhodnocování a v neposlední řadě i z hlediska produktivity práce [20]. Typická přesnost optimalizovaných metod na pevnou fázi je  $\geq 5\%$ , tedy horší než u obvyklých destruktivních metod [10], ovšem jejich pracnost je menší. Příklad přehledu chyb při přímé analýze pevných látek podle studie Bugaye et al. [9] je uveden v tabulkách 2 a 3.

Tabulka 2: Odhad chyby stanovení (%) aktivní složky metodami přímé analýzy pevných lékových forem infračervenou spektroskopií (IR) a RTG práškovou difrakcí (XRD) [9], celková R.S.D. označuje celkový odhad chyby stanovení.

<b>Zdroj chyby</b>	<b>IR</b>	<b>XRD</b>
Přístrojová reprodukovatelnost	0,7 (n = 6)	5,3 (n = 10)
Každodenní reprodukovatelnost	4,2 (n = 4)	6,0 (n = 6)
Poloha vzorku	6,1 (n = 10)	6,9 (n = 10)
Uspořádání vzorku	7,3 (n = 10)	7,6 (n = 10)
Homogenita vzorku	8,7 (n = 10)	6,2 (n = 10)
Celková R.S.D.	12,7	7,8



Tabulka 3: Vyhodnocení predikce koncentrace 5 práškových směsí léčiv metodami infračervené spektroskopie (IR) a RTG práškové difrakce (XRD) [9].

<b>Směs mono- a dihydrátu cefepimu s obsahem dihydrátu (% w/w)</b>	<b>DR mid-IR stanovená koncentrace dihydrátu (% w/w)</b>	<b>XRD stanovená koncentrace dihydrátu (% w/w)</b>
1,2	0,8	< MQL <sup>*)</sup>
3,0	2,7	3,3
3,8	3,1	3,8
5,2	5,1	4,9
7,5	6,3	7,5

<sup>\*)</sup> minimální kvantifikovatelná hladina

Pro svou rychlost jsou nedestruktivní metody perspektivní například k zjištění obsahové stejnoměrnosti, při které se pracuje s velkými soubory vzorků (10 případně 30 lékových forem), jak ji v mnoha případech požadují lékopisy [2,3,21]. Dalším atraktivním použitím nedestruktivních metod je operativní sledování změn při přípravě a skladování lékových forem [15,18,19]. Předmětem intenzivního výzkumu posledních deseti až dvaceti let je vývoj hardwaru a softwaru pro RTG práškovou difrakci a rozpoznání významu polymorfů [7,11]. V souvislosti s praktickou perspektivou použití nových metod přímé analýzy pevných látek je důležité zmínit první implementaci nedestruktivní kvantitativní metody do Českého lékopisu 2005 ve srovnání s vydáním z roku 1997, a to blízké infračervené spektrometrie (NIR).

Možnost přímého měření pevných lékových forem by znamenalo značné snížení pracnosti analýzy. Válcové tablety s planárním (rovinným) povrchem lze analyzovat konvenčními difúzně reflexními spektrometry a RTG práškovými difraktometry. Tvary vypouklé a oblé lze s jistými obtížemi ale i v tomto případě často bez předběžné úpravy analyzovat v transmisním režimu spektrálně i RTG difrakcí, ale vyžaduje to vhodně navržený držák vzorku. Spektrometry dnes ale pracují i s vláknovou optikou, takže reflexní měření s nimi už nevyžaduje definovaný planární povrch [22,23]. Přístroj

s vláknovou optikou dokonce umožnil identifikovat preparáty používané při *double-blind* testu měřením přes obal [22].

Při optimalizaci z jakéhokoliv hlediska je nutno nejdříve zvážit hlavní kritéria, uvedená v tabulce 1 a ujasnit si, zda pro daný problém je nejdůležitější co nejkratší doba analýzy na úkor snížení přesnosti, či naopak je přesnost či dosažená citlivost důležitější a doba analýzy má podružný význam. Dalším hlediskem či kritériem optimalizačního postupu je ekonomika zvolené metody. Ta se v podstatě odráží v pořizovací ceně přístroje, v provozních nákladech a ve kvalifikační náročnosti obsluhy. Kromě ekonomického hlediska jsou tu i další jako rychlost analýzy, její citlivost a v neposlední řadě i přesnost [20].

## 1.2 Perspektivní nedestruktivní metody pro analýzu léčiv

V této části se budou diskutovat hlavně spektrální a RTG difrakční metody, ačkoli se v literatuře objevuje celá řada dalších, často instrumentálně a ekonomicky poměrně náročných technik a technik ve stádiu výzkumu a vývoje. Spektrální a RTG difrakční metody jsou ekonomicky přijatelné a v ČR mají v současnosti dobrou tradici, takže není nijak nerealistické očekávat rozšiřování jejich praktického používání ve farmaceutické analýze.

### 1.2.1 Molekulová a elektronová spektroskopie

Při přímé analýze pevných lékových forem se velmi značně uplatňují specifické vlastnosti pevných látek. Jejich fyzikální vlastnosti jsou silně ovlivněny velikostí a tvarem částic [9,11,17,24,25], a to platí i pro výsledné spektrální vlastnosti, jako je například poměr spekulárního odrazu, difúzní reflexe a transmise při jejich interakci se zářením. Spektra tablet se díky tomu liší od spekter z nich získaných prášků [26] a závisí i na tlaku při lisování tablet [27] a tloušťce a tvaru pevné lékové formy [25]. Zvláště vlastnosti povrchu tablet jsou těmito faktory silně ovlivněny, takže obvykle se při spektrální analýze v transmisním režimu (je-li možná díky dostatečně malému absorpčnímu koeficientu vzhledem k tloušťce lékové formy) dosahuje vyšší reprodukovatelnosti měření než v odrazovém režimu [21]. Je naprosto nesprávné při kalibraci spektrálních nedestruktivních metod používat práškové směsi čistých složek, nikoli lékové formy připravené identickým postupem jako analyzovaný lék [15,28,29].

#### **Molekulová spektroskopie (blízká infračervená, infračervená, Ramanova)**

Infračervená (IR nebo FT-IR) spektroskopie se zabývá měřením a vyhodnocováním spekter molekul absorbujících infračervené záření o vlnových délkách 750 nm–100  $\mu\text{m}$ , tj. o vlnočtech 13333–10  $\text{cm}^{-1}$ . Infračervené záření lze rozdělit na záření v oblasti blízké

(*near-infrared*, NIR nebo nr-IR), které navazuje na oblast viditelného záření (400–750 nm, tj. 25000–13333 cm<sup>-1</sup>), střední (*mid-infrared*, MIR) (2,5–50 μm, tj. 4000–200 cm<sup>-1</sup>) a vzdálené (*far-infrared*, FIR) (50–100 μm, tj. 200–10 cm<sup>-1</sup>). Záření vzdálené infračervené oblasti vyvolává změnu rotačních stavů molekul, u nichž je potřebná energie malá, při působení záření střední a blízké infračervené oblasti dochází k vibračně-rotačním přechodům, kdy se současně mění vibrační i rotační stav molekuly [30,31].

Blízká infračervená oblast (NIR) leží v rozsahu 750 nm až 2500 nm (asi 13333 cm<sup>-1</sup> až 4000 cm<sup>-1</sup>). V některých případech se nejužitečnější informace nalézají v rozsahu spektra asi 1700 nm až 2500 nm (asi 6000 cm<sup>-1</sup> až 4000 cm<sup>-1</sup>).

Při interpretaci infračervených spekter sledujeme polohu a tvar absorpčních pásů, charakteristických pro danou funkční skupinu nebo strukturní motiv, a jejich intenzitu, danou mimo jiné koncentrací analytu ve vzorku. Měření transparentních vzorků je možné provádět ve všech skupenstvích, měření pevných vzorků se provádí transmisně po jejich dispergování v oleji, KCl nebo KBr, případně odrazem, ať už difúzním (DRIFTS) nebo spekulárním (IR mikroskopie). V blízké infračervené oblasti je možné měřit transmitanci, difúzní reflektanci nebo transflektance (kombinace transmitance s reflektancí).

Velkou výhodou reflektančních technik měření jsou minimální nároky na přípravu vzorků. Pevné vzorky mohou být měřeny metodou difúzního odrazu (reflexe) buď přímo (především v blízké infračervené oblasti), nebo po smíchání s práškovým KBr (metoda DRIFT). Reflexní měření jsou vhodná tehdy, není-li možná nebo je zdlouhavá příprava vzorku pro transmisní měření.

Množství pohlceného záření se označuje jako absorbance A, nebo se vyjadřuje velikostí propustnosti T – transmitance. Tyto veličiny jsou definovány jako:

$$T = I/I_0 \quad (\text{rovnice 1})$$

$$A = -\log_{10}(I/I_0) \quad (\text{rovnice 2})$$

kde  $I_0$  je intenzita dopadajícího záření a  $I$  intenzita záření po absorpci.

Ramanova spektrometrie je podobná infračervené spektrometrii, je ale založená na tzv. Ramanově jevu (Ramanově rozptylu). Prochází-li světelný paprsek nějakým

prostředím, je určitá jeho část absorbována, část projde beze změny a část je rozptýlena. Je-li srážka fotonu s látkou dokonale pružná, světlo se rozptýlí beze změny vlnové délky. Je-li srážka nepružná, dojde k rozptylu (změně směru šíření světla) a současně se změní vlnová délka světla. Pokud je dopadající světlo monochromatické, bude ve spektru rozptýleného záření jistý počet čar, jejichž vlnová délka bude ve srovnání s původní vlnovou délkou posunuta o energii vibračně-rotačních přechodů.

Zdrojem monochromatického záření při Ramanově spektroskopii je laser. Vzorek může být plynný, kapalný i pevný (krystalický i amorfní) a lze studovat organické i anorganické látky. Výhodou metody je malé množství vzorku potřebné k analýze. V současnosti jsou nejužívanější přístroje, tzv. mikrospektrometry, umožňující cílenou analýzu jednotlivých objektů do velikosti 5–10  $\mu\text{m}$ . Ramanův rozptyl v závislosti na vlnové délce záření se detekuje a zaznamenává. Ramanovu spektrometrii lze stejně jako infračervenou spektrometrii použít k identifikaci látek a ke kvalitativní a za výjimečných okolností i kvantitativní analýze. Pro jednodušší přípravu vzorků oproti infračervené spektrometrii se Ramanových spekter využívá stále častěji ve farmaceutickém průmyslu, např. ke stanovení účinných látek v tabletách a dokonce i k rozlišení polymorfů [10,11,32,37].

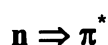
### **Elektronová spektrometrie (ultrafialová a viditelná oblast, UV–Vis)**

V ultrafialovém a viditelném spektru se provádí tzv. absorpční spektrální analýza v oblasti elektronových spekter – konvenčně jde o sledování absorbance při vlnových délkách od 200 do 750 nm molekulami zředěných roztoků látek, ale lze měřit i spektra pevných látek, většinu metodou difúzní reflexe (DRS). Při vlnové délce pod 200 nm se spektroskopie příliš nepoužívá, protože dochází k silné absorpci už vzduchem.

V oblasti vlnových délek od 200 do 750 nm absorbují mnohé organické sloučeniny a komplexy s centrálním atomem (iontu) přechodného prvku [30,31,33]. V organických sloučeninách nejčastěji dochází k následujícím typům elektronových přechodů.



Jedná se o přechod mezi vazebnými ( $\pi$ ) a antivazebnými ( $\pi^*$ ) molekulovými orbitaly. Sloučeniny, u kterých dochází k tomuto typu elektronových přechodů, obsahují násobné nebo aromatické vazby. Absorpční maxima jsou v oblastech od 200 do 250 nm a pokud sloučenina obsahuje konjugovaný systém dvojných vazeb, dochází k posunu absorpčních maxim až do viditelné oblasti (absorpční maxima jsou v oblasti vyšších vlnových délek). V analytické praxi se využívají hlavně tyto elektronové přechody, protože mají vysokou intenzitu absorpčních pásů.



Jedná se o přechod mezi nevazebnými ( $n$ ) a antivazebnými ( $\pi^*$ ) molekulovými orbitaly, tj. o excitaci volného elektronového páru ve skupinách jako je karbonyl, karboxyl, skupinu nitro-, azo-, thionyl apod., obvykle v oblasti 250 až 300 nm. Nevazebný elektronový pár se ale může zapojit do konjugace s  $\pi$  systémem a posunovat se směrem do viditelné oblasti. Ukázky typických poloh přechodů  $\pi \Rightarrow \pi^*$  a  $n \Rightarrow \pi^*$  jsou v tabulce 4.

Ostatní přechody, jako  $n \Rightarrow \sigma^*$ ,  $\sigma \Rightarrow \sigma^*$ ,  $\sigma \Rightarrow \pi^*$ , a  $\pi \Rightarrow \sigma^*$  se nevyžívají, protože nastávají při příliš nízkých vlnových délkách.

Tabulka 4: Absorpční maxima odpovídající přechodům  $\pi \rightarrow \pi^*$  a  $n \rightarrow \pi^*$  [33].

Funkční skupina	$\lambda_{\max}$	
	Přechod: $\pi \rightarrow \pi^*$	Přechod: $n \rightarrow \pi^*$
> C = C <	170	-
> C = O	166	280
> C = N -	190	300
- N = N -	-	340
> C = S	-	500
- N = O	-	665

Protože absorpční koeficienty pevných látek jsou obvykle poměrně vysoké, není možné měřit jejich spektra transmisně, ale běžně dostupné jsou nástavce k difúzně reflexním měřením (DRS). Pokud je vrstva práškového nebo pevného vzorku “nekonečně tlustá”, používá se často pro přepočítání změřené reflektance vzorec podle teorie Kubelky a Munka

$$f(R_{\infty}) = \frac{(1 - R_{\infty})^2}{2R_{\infty}} = \text{absorbance} \quad (\text{rovnice 3})$$

kde  $R_{\infty}$  je reflektance dostatečně tlusté vrstvy vzorku a  $f(R_{\infty})$  je absorbance v jednotkách Kubelka-Munk (KM). Tato veličina bude v DRS spektrech označena absorbance. Bohužel teorie Kubelky a Munka vykazuje jisté odchylky a to, že výsledné hodnoty KM neodpovídají zcela přesně složení [34].

### 1.2.2 Analytické využití spektroskopických metod

Spektra se zpracovávají buď metodou kalibrační křivky srovnáním intenzity jednoho absorpčního pásu nebo absorpce při jediné vlnové délce a koncentrace [21,35,36,37] nebo zpracováním celého úseku nebo celého spektra regresní analýzou [21,23,26,35]. Poměrně dobré výsledky dává metoda kalibrace pomocí poměru intenzit dvou absorpčních pásů [37,38]. Při zpracování celých úseků spekter se používá násobná lineární (multilineární) regrese (*multiple linear regression*, MLR) [35,39,40], ale protože směsi se často nechovají aditivně, používají se složitější metody, např. metoda částečných nejmenších čtverců (*partial least squares*, PLS) [21,23,40] a regrese hlavních komponent (*principal component regression*, PCR) [28]. Výběr vlnové délky může zvýšit účinnost kalibračních modelů. V některých případech je užitečné vyloučit určité oblasti vlnových délek spektra, např. oblasti s malým poměrem signálu k šumu [21]. Analytická kritéria, která jsou brána v úvahu při validaci NIR metod, jsou podobná kritériím, která se vyžadují pro jakoukoliv jinou analytickou metodu. Sledované validační parametry jsou specifická, linearita, rozsah, správnost, přesnost, robustnost a odlehle výsledky [2]. Ačkoli vysoce se překrývající absorpce v NIR oblasti (750–

2500 nm) byly dříve pokládány za příliš komplikované pro rutinní nebo praktickou interpretaci, dnes NIR spektrum jedné substance nebo vícesložkového vzorku může být změřeno a analyzováno za méně než jednu minutu, čímž se získá obrovské množství informací. Jednoduchost a přesnost kombinované s rychlostí dává NIR spektroskopii enormní výhody oproti tradičním mokrým chemickým metodám, chromatografii a spektroskopickým metodám [25].

Spektroskopie v blízké infračervené oblasti (NIR) se využívá většinou k analýze pevných lékových forem s jednou aktivní složkou absorbující v oblasti, kde jsou pomocné látky "průhledné". Reflexní NIR spektrometrií byl analyzován paracetamol [35] a vitamín C [40] v jednosložkových tabletách. NIR spektroskopie v transmisním uspořádání byla použita k analýze obsahu paracetamolu v 4 mm tlustých tabletách s jednou účinnou a několika pomocnými látkami s chybou stanovení 5% [21,26]. Transmisní NIR spektroskopie byla úspěšně použita i k analýze jednosložkových potahovaných tablet s jednou aktivní látkou, diphenhydramin hydrochloridem (17%) v matrici mikrokrystalické celulózy, stearanu hořečnatého, laktózy a levilitu [26]. Potah tablety díky malé tloušťce a malé absorbanci v NIR nerušil stanovení. Rychlosti měření NIR bylo využito ke sledování homogenity během míchání farmaceutické směsi složené z jedné účinné (otilonium bromid) a tří pomocných látek (škrobu, karboxymethylovaného škrobu a mikrokrystalické celulózy) [19]. Protože jednou ze složek nejvíce absorbujících v oblasti NIR jsou OH skupiny a voda, používá se tato metoda s výhodou ke stanovení vlhkosti [12] a vody např. v hydrátu ampicilinu [25]. Ke kvantitativní analýze bylo úspěšně použito i difúzního NIR spektrometru s optickými vlákny, a to při analýze tablet gemfibrozilu a přídavných látek [41] a otilonium hydrochloridu a přídavných látek [42].

Běžně dosahované chyby analýzy NIR spektroskopii se pohybují do 5% [12], ale někteří autoři udávají i mnohem optimističtější hodnoty, např. 0,9% [41,42]. Problém přesnosti je často problémem rozdílu mezi jednotlivými kyvetami, reprodukovatelné plnění jedné kyvety, a vlastní měření. Plugge a spol. [25] při testu těchto operací zjistili následující relativní chyby měření: 0,48% při měření v deseti různých kyvetách, 0,30%



při deseti měřeních v jedné kyvetě a 0,12% při deseti měřeních bez výměny nebo přeplnění kyvety.

IR a DRIFT spektroskopie se může používat i při analýze látek, které jsou si strukturně velmi podobné, například polymorfů. Tato schopnost IR byla ukázána na příkladu nového protizánětlivého léčiva ((±)-7-[3-(4-acetyl-3-methoxy-2-propylfenoxy)propoxy-3,4-dihydro-8-propyl-2H-1-benzopyran-2-karboxylové kyseliny, v přebytku druhé formy polymorfu léčiva pomocí multilineární regrese a kalibrace pomocí obohacení léčiva méně zastoupeným polymorfem [13]. IR ve variantě kalibrační křivky pomocí dvou absorpčních pásů byla použita také k analýze poměru ortorhombického a monoklinického polymorfu paracetamolu v práškovém preparátu [37] a k analýze polymorfů I a II hydrogensíranu clopidogrelu [38]. DRIFTS byla použita ke kvantitativní analýze polymorfů delavirdinu methansulfonátu, nenukleosidního inhibitoru reverzní transkriptázy, enzymu vyskytujícího se v HIV-1 [14], a dále polymorfů ranitidin hydrochloridu s protivředovými účinky [15]. Pomocí DRIFTS byla provedena kvantitativní analýza dihydrochloridu cefepimu vedle jeho monohydrátu [9].

Meze detekce IR spektroskopie se uvádějí kolem 1% [13], 3-5% [14], 2,4% v prášku [15], nebo dokonce jen 0,3% [9]. Mez detekce IR spektroskopie je pochopitelně silně závislá na konkrétních látkách, které se mají analyzovat, a na matici pomocných látek, protože v IR je překryv absorpčních pásů velmi obvyklý jev.

Difúzně reflexní UV spektroskopie byla použita k analýze práškové směsi bezvodého guanidin bisulfátu a  $\alpha$ -D-laktózy monohydrátu [36]. Nedestruktivní měření pevných lékových forem v UV oblasti nebylo dosud v literatuře popsáno.

FT-Ramanova spektroskopie se může stejně jako IR a DRIFT spektroskopie použít při analýze polymorfů, například k analýze tablet obsahujících dvě formy prednisolonu [32]. FT-Ramanovou spektroskopie se uplatila rovněž ve variantě kalibrační křivky pomocí dvou absorpčních pásů k analýze poměru ortorhombického a monoklinického polymorfu paracetamolu v práškovém preparátu [37]

### 1.2.3 RTG prášková difrakce

Při analýze RTG difrakcí se silně uplatňuje přednostní orientace [10] a anizotropie krystalů, které při lisování tablet způsobují deformaci některých difrakčních linií, dále dochází při míšení složek k jejich částečné amorfizaci a tedy ke snížení intenzity difrakčního signálu [6,10,43,44] a k rozšíření difrakčních linií zmenšováním velikosti krystalitů [6,44]. V RTG difrakci se mnohé z těchto jevů ovlivnění signálu vlivem kolísající krystalinity a lisování nazývají texturními vlivy. Důsledkem je nutnost kalibrace pomocí referenčních materiálů stejné formy jako je analyzovaný vzorek [47]. Přes tyto problémy je RTG prášková difrakce metoda, jejíž potenciál při kvantitativní analýze pevných lékových forem nebyl dostatečně využit.

Rentgenová prášková difrakční analýza [45] je založená na interakci rentgenového záření s pevným vzorkem, při které dochází k difrakci na krystalové mřížce. Touto metodou lze tedy využít při studiu krystalických látek, nikoli látek strukturně neuspořádaných (amorfních).

Dopadá-li na krystalovou strukturu monochromatické RTG záření, jehož vlnová délka je srovnatelná se vzdáleností mezi atomy, tj. řádově 0,1 nm, stávají se elektronové obaly jednotlivých atomů struktury zdrojem RTG záření o stejné vlnové délce. Na difrakci rentgenového záření se můžeme dívat jako na odraz záření od soustavy rovnoběžných krystalových rovin spojený s interferencí. Původní paprsek dopadá na systém rovin pod úhlem  $\theta$  (theta). Po dopadu se rozdělí do dvou směrů, jeden paprsek pokračuje v původním směru, druhý paprsek se odrazí pod úhlem odrazu  $\theta$ . Interferencí se záření zesiluje pouze v těch směrech (difrakčních úhlech), které splňují Braggovu podmínku:

$$n \cdot \lambda = 2 \cdot d \cdot \sin(\theta) \quad (\text{rovnice 4})$$

kde  $n$  je celé číslo (řád difrakce),  $\lambda$  vlnová délka interferujícího záření,  $d$  mezirovinná vzdálenost, a  $\theta$  difrakční úhel. V ostatních směrech (difrakčních úhlech)

je odražené RTG záření potlačeno. Intenzita zesílení rentgenového záření je závislá na počtu difraktujících ploch v daném difraktujícím úhlu.

Výsledkem měření je difraktogram, který vyjadřuje závislost difrakční intenzity na difrakčním úhlu. Zesílení intenzity rentgenového záření při určitém úhlu se v difraktogramu projeví jako tzv. difrakční maximum konvenčně označované jako difrakční linie. Skoro každá krystalická látka poskytuje jedinečný difraktogram a na jeho základě je identifikována. Identifikace se provádí srovnáním získaného difraktogramu s difraktogramy všech dosud studovaných látek. K tomu se nejčastěji používají speciální vyhodnocovací programy a databáze difraktogramů, např. databáze ICSD (*Inorganic Crystal Structure Database*) a databáze CSD (*Cambridge Structural Database of Organic and Metal-Organic Structures*).

RTG difraktometr se skládá ze zdroje záření, goniometru a detektoru. Zdrojem RTG záření jsou rentgenové lampy (tzv. rentgenky). Každá rentgenka obsahuje dvě elektrody. Katodu tvoří přímo žhavená wolframová spirála, která termoemisí uvolňuje elektrony. Proti katodě je umístěna anoda, což je kovová destička, nejčastěji vyrobená z Cu, Mo, Co, Fe nebo Cr. Na elektrody se vkládá napětí 20–60 kV, které urychluje elektrony emitované z katody. Prostor mezi elektrodami je evakuován, aby srážkami nedocházelo k ionizaci plynu a ke zpomalení elektronového svazku. Dopadem elektronů na anodu, kde se jejich energie mění z větší části v teplo (proto je anoda chlazená vodou) a pouze asi 1 % jejich energie se využije na emisi rentgenového záření. Elektrony vyražené z katody jsou nahrazeny elektrony z hladin o vyšších energiích. Tím dojde k vyzáření charakteristického rentgenového záření s vlnovými délkami, které odpovídají rozdílů v energiích hladin. Nejčastěji se používá záření vzniklé vyražením elektronů z hladiny K, které jsou nahrazeny elektrony z hladin L či M. Vzniká tak série charakteristických linií  $K_{\alpha 1}$ ,  $K_{\alpha 2}$  a  $K_{\beta}$ . Při difrakční analýze se nejčastěji pracuje s váženým průměrem dubletu K linií (např. Cu  $K_{\alpha} = 0,15418$  nm, Co  $K_{\alpha} = 0,19373$  nm). Vzniklé záření obsahuje složku spojitou a charakteristickou. Spojité záření je složeno z různých vlnových délek a je způsobeno zpomalováním emitovaných elektronů na elektronových obalech atomů anody. Charakteristické a spojité spektrum se separují monochromátory. Další částí difraktometru je goniometr s detektorem. Goniometr

zajišťuje pohyb vzorku vůči záření a jeho součástí jsou clony, které omezují jak horizontální tak vertikální rozbíhavost primárního RTG svazku.

K vyhodnocení difraktogramů se používá buď metoda kalibrační křivky, kdy se vyhodnocuje intenzita jedné [8,37] nebo několika vybraných difrakčních linií [8,46,47], případně se její intenzita srovnává s intenzitou linie interního standardu (např. LiF [5]), nebo se zpracovává celý difraktogram (*full-profile fitting, whole pattern processing*) [8], například Rietveldovou metodou [5,48]. Zpracování celého difraktogramu Rietveldovou metodou je správnější z metodického hlediska [8], ale k jeho provedení je třeba znát strukturní informace o všech krystalických složkách [5], které ale nejsou vždy známe.

Druhou slabinou rentgenové práškové difrakce je tzv. přednostní orientace krystalů, což je jev, kdy závisí intenzity difrakčních linií na úhlu, který svírají s krystalovou rovinou, která je nejvíc vyvinuta nebo nejvíc potlačena. Přednostní orientace může být způsobena opticky viditelnou anizometrií krystalů, tj. jejich výrazným jehlicovitým nebo destičkovitým tvarem, nebo existencí krystalových defektů v některých specifických krystalografických rovinách. Tento jev se při velkém mezilaboratorním testu práškové difrakční analýzy, který organizovala *International Union of Crystallography*, ukázal jako velmi významná komplikace kvantitativní analýzy [49]. Rovinu přednostní orientace krystalů je proto občas třeba odhadnout metodou pokus-omyl při optimalizaci algoritmu zpracování difraktogramu [8]. Nepříjemnou vlastností předností orientace je, že se zvýrazní nebo dokonce začne uplatňovat až po vylisování tablety [6,44,50] a že v některých případech roste s intenzitou lisování [6,8]. Přednostní orientaci je možné ošetřit vhodnou matematickou procedurou při zpracování difraktogramů. Podstatně se vliv přednostní orientace omezí zpracováním celého difraktogramu nebo prakticky všech difrakčních linií, tj. jak linií postižených zesílením tak zeslabením intenzit díky přednostní orientaci [8,10], a pokud se používá metoda kalibrační křivky k přímé analýze, musí se používat stejně vždy připravených tablet [47]. V poslední době se pro fyzické snížení přednostní orientace měří difraktogramy s malým množstvím prášku naspaným do kapiláry [51].

Rentgenová prášková difrakce byla použita při identifikaci prášku i tablet dvousložkového léčiva, obsahujícího trimethoprim a sulfamethoxazol, a tříložkového

léčiva, které obsahovalo paracetamol, kyselinu salicylovou a kofein [4]. Další práce se zabývala kvantitativní difrakční analýzou vzorku léčiva obsahujícího bezvodý  $\alpha$ -barbamazepin,  $\beta$ -barbamazepin a barbamazepin dihydrát s použitím LiF jako vnitřního standardu [5]. Byla popsána nedestruktivní kvalitativní analýza tablet obsahujících acetaminophen, acetylsalicylovou kyselinu, kofein a pomocné látky (placebo: mikrokystalická celulóza, hydroxypropyl methylcelulóza a hydroxypropyl celulóza) [4]. RTG prášková difrakce byla použita i ke kvantitativní analýze poměru mono- a dihydrátu cefepimu dihydrochloridu [9] a dvou krystalových forem a hydrátů vývojového léčiva firmy Merck [46].

Běžně dosahované relativní chyby stanovení práškovou RTG difrakcí jsou  $<\pm 5\%$  [5]. Jako mez detekce metody se obvykle uvádí 1% složky ve směsi, Bugay [9] uvádí hodnotu 0,75 hm-%. Při RTG difrakčním odlišení polymorfů s podobnými difraktogramy byla nalezena mez detekce minoritní složky  $\beta$ -karbamazepinu 2 hm-% vzhledem k oběma polymorfům karbamazepinu [4]. Mez detekce práškovou RTG difrakcí závisí na aktuálně analyzovaných látkách v mnohem menší míře než při spektroskopických metodách. Platí to ale pouze za předpokladu, že složka je krystalická a poskytuje použitelný difrakční záznam, nikoliv difúzní haló jako amorfní látky.

### **1.3 Stejnomenost dávkových jednotek**

K zajištění konzistence dávkových jednotek by měla každá jednotka ve výrobní šarži léčiva mít obsah aktivních složek v úzkém rozmezí kolem údaje uvedeného v označení na obalu. Kontrola stejnoměrnosti je jednou z oblastí, kde by se v budoucnu mohlo využívat nedestruktivních analytických metod [21], protože se zde vyžaduje větší počet analýz a kontroluje se vlastně jen variabilita v rámci celkem úzkého rozmezí složení.

Dávkové jednotky jsou definovány jako lékové formy obsahující jednu dávku nebo část dávky léčivé látky v každé jednotce. Termín „stejnomenost dávkových jednotek“ je definován jako míra stejnoměrnosti množství léčivé látky mezi dávkovými jednotkami. Požadavek stejnoměrnosti se vztahuje na každou aktivní složku přítomnou

v dávkových jednotkách obsahujících jednu nebo více aktivních složek, pokud není v Českém lékopise 2005 určeno jinak.

### *Obsahová stejnoměrnost*

Zkouška na obsahovou stejnoměrnost dávkových jednotek přípravků, konkrétně u pevných lékových forem, což je případ v této práci studovaného tříložkového analgetika, je založena na stanovení jednotlivých obsahů aktivních složek (konkrétně obsahů 3 aktivních složek) za pomoci vhodné analytické metody u deseti, případně třiceti, namátkově vybraných jednotek zkoušeného přípravku a určení, zda jsou jednotlivé obsahy ve stanovených limitech. Podle Českého lékopisu 2005 se vypočítává hodnota přijatelnosti, což je obdoba směrodatné odchylky stanovení obsahů. Nejvyšší přípustná hodnota přijatelnosti se uvádí hodnota 15,0, která odpovídá přibližně relativní směrodatné odchylce 15% [2].

## **1.4 Zkoumané analgetikum ve formě nepotahovaných tablet**

Složení ternárního analgetika:

Obsah účinných látek v 1 tabletě:

Paracetamolum	325 mg
Guaifenesinum	130 mg
Coffeinum	70 mg

Pomocné látky: Předželatinovaný kukuřičný škrob, povidon 30, sodná sůl karmelosy, kyselina stearová, stearan hořečnatý.

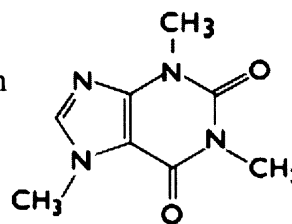
Celkový obsah všech pomocných látek v 1 tabletě je 65 mg.

Popis tablet: Bílé, kulaté, s průměrem 1,3 cm a tloušťkou asi 0,4 cm a s půlicí rýhou na jedné straně.

Dále uvedené vlastnosti jsou převzaty z Českého lékopisu 2005 [2] a příbalového letáku zkoumaného analgetika.

### Kofein

Chemický název: 1,3,7-trimethyl-3,7-dihydro-1*H*-purin-2,6-dion



*Popis a fyzikálně–chemické vlastnosti:*

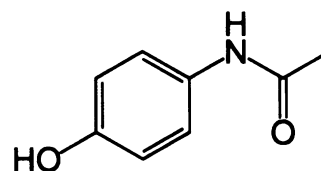
Kofein tvoří bílé, hedvábně lesklé jehlicovité krystalky, je bez zápachu a má hořkou chuť. Jeho teplota tání je 234–237°C, při mírném zahřívání sublimuje. Poměrně dobře se rozpouští ve vodě (1:60), ve vroucí vodě se rozpouští velmi dobře, podobně i v chloroformu, těžce se rozpouští v 96%ním ethanolu a v etheru. Dále je kofein možno rozpouštět v koncentrovaných roztocích alkalických benzoanů a salicylanů.

*Terapeutické účinky a použití:*

V terapii se kofein používá hlavně pro své působení na centrální nervovou soustavu a psychostimulační působení, méně pro jeho periferní účinky – vazodilatační a přímý účinek na srdeční sval. Pro schopnost kofeinu zvyšovat permeabilitu kapilár v mozku a pro jeho analeptické působení v oblasti prodloužené míchy je nepostradatelnou součástí různých analgetických, ale i jiných směsí. Uplatňuje se zde jednak jeho stimulační účinek, který zmírňuje tlumivé působení hypnotik, a jednak potencuje účinek analgetik a antipyretik.

### Paracetamol

Chemický název: *N*-(4-hydroxyfenyl)acetamid



*Popis a fyzikálně–chemické vlastnosti:*

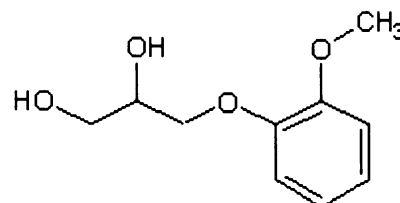
Paracetamol je bílý krystalický prášek s teplotou tání 168–172°C. Mírně se rozpouští ve vodě, velmi dobře se rozpouští v 96%ním ethanolu, naproti tomu se velmi špatně rozpouští v dichlormethanu.

### *Terapeutické účinky a použití:*

Paracetamol je běžným analgetickým a antipyretickým léčivem, které snižuje tělesnou teplotu, ulevuje při horečce, nachlazení, chřipce, bolestech hlavy, zádoových či menstruačních potížích.

### **Guaifenesin**

Chemický název: (2*RS*)-3-(2-methoxyfenoxy)propan-1,2-diol



### *Popis a fyzikálně–chemické vlastnosti:*

Guaifenesin je bílý nebo téměř bílý krystalický prášek s teplotou tání 79–83°C. Mírně se rozpouští ve vodě, velmi dobře se rozpouští v 96%ním ethanolu, naproti tomu se velmi špatně rozpouští v etheru.

### *Terapeutické účinky a použití:*

Guaifenesin patří do skupiny centrálních myorelaxancií odvozených od propandiolu. Zvyšuje analgetické a snižuje akutní toxické účinky paracetamolu. Snižuje psychické a emoční napětí s pocitem úzkosti, má mírně sedativní účinky, snižuje svalový tonus a působí expektoračně (usnadňuje vykašlávání hlenů z dýchacích cest při akutních infekcích dýchacích cest). Guaifenesin se používá také při léčbě fibromyalgie, což je chronický nezánettivý muskuloskeletární syndrom s plošnou bolestivostí a body citlivými na tlak.



## **1.5 Cíl práce**

Cílem práce bylo testování metod přímé analýzy pevných látek na přípravku analgetika dodávaného firmou Zentiva. Práce měla postupovat třemi dílčími směry:

- ověřením možnosti nedestruktivní analýzy obsahové stejnoměrnosti pevné lékové formy metodami UV–Vis DRS a XRD bez jakékoli předběžné úpravy tablet,
- ověřením možnosti kvantitativní analýzy přímou metodou analýzy pevné lékové formy XRD bez úpravy tablet případně s jejich úpravou mechanickým rozetřením, a
- ověření možnosti kvantitativní analýzy pevné lékové formy metodou IR po jejich rozetření do konvenční KBr tablety.

K analýze byly použity složky i produkty dodané firmou Zentiva a jako podklad k hodnocení metod analýzy pevných látek byly využity některé výsledky HPLC analýzy prováděné v laboratořích výrobce.

## 2. Experimentální část

### 2.1 Chemikálie

Methanol p.a.  $\text{CH}_3\text{OH}$  (Lachema)

Kyselina octová p.a.  $\text{CH}_3\text{COOH}$  (Lachema)

Bromid draselný p.a. pro IR spektroskopii  $\text{KBr}$  (Sigma-Aldrich)

Paracetamol  $\text{C}_8\text{H}_9\text{NO}_2$  (pracovní standard Zentiva)

Guaifenesin  $\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{O}_4$  (pracovní standard Zentiva)

Kofein bezvodý  $\text{C}_8\text{H}_{10}\text{N}_4\text{O}_2$  (pracovní standard Zentiva)

Paracetamol, minimum 99,0%  $\text{C}_8\text{H}_9\text{NO}_2$  (Sigma-Aldrich)

Guaifenesin, minimum 98%  $\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{O}_4$  (Sigma-Aldrich)

Kofein bezvodý, čistota 99%  $\text{C}_8\text{H}_{10}\text{N}_4\text{O}_2$  (Sigma-Aldrich)

Směs pomocných látek, tzv. placebo (tj. předželatinovaný kukuřičný škrob, povidon 30, sodná sůl karmelosy, kyselina stearová, stearan hořečnatý) (firma Zentiva)

Destilovaná voda  $\text{H}_2\text{O}$

Připravil jsem si dvě práškové kalibrační sady (každá obsahovala 5 modelových směsí), které vycházely z deklarovaného složení analgetika. V první kalibrační řadě se měnila koncentrace guaifenesinu a to o  $\pm 4$  hm-% a o  $\pm 2$  hm-% od deklarovaného obsahu guaifenesinu 24,8 hm-%. V druhé kalibrační řadě se měnila koncentrace kofeinu a to o  $\pm 4$  hm-% a o  $\pm 2$  hm-% od deklarovaného obsahu kofeinu 13,3 hm-%. Tyto sady jsem připravil smícháním a dokonalým rozetřením čistých aktivních složek a pomocných látek v achátové misce.

## **2.2 Analytické metody**

### **2.2.1 Difúzně reflexní UV–Vis spektroskopie (DRS)**

#### **Příprava a měření vzorků**

Celé tablety jsem nalepil stranou s půlicí čarou na tvrdou průhlednou folii a druhou stranou tablety jsem je vložil do nástavce na měření reflektance a změřil jsem spektrum. Práškové vzorky čistých látek jsem měřil v křemenných (suprasilových) kyvetách (Hellma, Německo) o tloušťce 1 cm. Všechny měření jsem prováděl proti Spectralonu® (standardní BaSO<sub>4</sub>, Labsphere, Inc, USA) v rozsahu vlnových délek 250–450 nm a při rychlosti měření 500 nm/min. Měřil jsem na spektrometru UV–Vis Perkin Elmer Lambda 35 s nástavcem na měření reflektance RSA-RE-20 (Labsphere, Inc, USA) s programem UV Winlab verze 2.85.04, Perkin Elmer, Inc., 2000.

### **2.2.2 Konvenční UV–Vis spektroskopie roztoků**

#### **Příprava a měření vzorků**

U jednotlivých tablet se navažovalo cca 400 mg, u vzorků průměrů šarží (průměr z 5 tablet) se navažovalo cca 2600 mg. Tyto navážky se smíchaly s 250 ml destilované vody v 400 ml kádince a jejich obsah se deset minut intenzivně míchal magnetickou míchačkou. Poté se obsah kádinky přefiltroval přes filtr s označením 389 (Filtrak, Německo). Filtrát se jímal do 500 ml odměrné baňky. U roztoků jednotlivých tablet se provedlo ředění 30 x, tj. odebralo se z připraveného 500 ml roztoku analgetika 5 ml do 150 ml odměrné baňky a doplnila se po rysku destilovanou vodou. U roztoků průměrů šarží se provedlo ředění 200 x, tj. odebralo se z připraveného 500 ml roztoku analgetika 1,25 ml do 250 ml odměrné baňky a doplnila se po rysku destilovanou vodou. Při přípravě roztoků čistých účinných látek se navažovalo 99 mg guaifenesinu, 97 mg kofeinu a 76 mg paracetamolu, poté se navážky převedly do 250 ml odměrných baněk a doplnily se destilovanou vodou. Zásobní roztoky účinných látek se zředily 10 x. Takto

připravené roztoky vzorků analgetika a čistých látek se měřily v křemenných (suprasilových) kyvetách (Hellma, Německo) o tloušťce 1 cm proti destilované vodě v rozsahu vlnových délek 250–450 nm a při rychlosti měření 500 nm/min. Měřilo se na spektrometru UV–Vis Perkin Elmer Lambda 35 s programem UV Winlab verze 2.85.04, Perkin Elmer, Inc., 2000.

### **2.2.3 Infračervená spektroskopie (IR)**

#### **Příprava a měření vzorků**

Vzorky tablet analgetika a obě kalibrační řady byly měřeny pomocí infračervené spektroskopie tzv. tabletovou metodou. Tableta analgetika byla rozmělněna v achátové misce a po navážení (1 až 1,5 mg) byl prášek sušen, aby se omezila adsorpce vody, asi půl minuty na spirálovém vařiči při teplotě zhruba 40°C. Vyžíhaný spektroskopicky čistý KBr byl navážen (cca 300 mg) a smíchán se sušeným naváženým práškem analgetika. Obě látky se homogenizovaly v třecí achátové misce. Po homogenním smíchání byla směs léčiva a KBr lisována v lisovacích formách pomocí ručního lisu za tlaku 10 kPa·cm<sup>-2</sup> na průhlednou tabletku o průměru asi 1 cm a tloušťce asi 2 mm. Vzorky tablet byly měřeny na FT–IR spektrometru Nicolet NEXUS 670 a DTGS detektorem. Rozsah měření byl v oblasti 4000–400 cm<sup>-1</sup>, s 32 scany a rozlišením 4 cm<sup>-1</sup>. Naměřená infračervené spektra byla upravena korekcí na konstantní pozadí a byla vyhodnocena pomocí programu EZ Omnic E.S.P. 7.2 (Thermo Electron Corporation, USA).

### **2.2.4 RTG prášková difrakční analýza (XRD)**

#### **Příprava a měření vzorku**

Analýza tablet léčiva se pomocí práškové RTG difrakce prováděla umístěním tablety na goniometrickou hlavičku v difraktometru. Pro nastavení správného umístění tablety byl použit mikroskop (viz Přílohová část obrázků 30 až 33), který byl namontován na

rameno goniometru místo detektoru. Natačením kolébky držáku vzorku bylo dosaženo vyrovnaní měřené plochy vzorku do roviny difrakce (při nulovém úhlu ramena) a posouváním sáněk na držáku se vzorek umístí do polohy, v níž se při otáčení nevychyluje. Vzorky tablet byly měřeny na difraktometru PANalytical X'Pert PRO vybaveném CoK $\alpha$  rentgenkou (napětí 40 kV, proud 30 mA) a detektorem X'Celerator. Rozsah měření byl 4–60° 2 $\theta$ , krok měření byl 0,00835 stupňů a dobou měření v každém kroku 100 s. Naměřené difraktogramy byly vyhodnoceny pomocí programu X'Pert HighScore (PANalytical, Holandsko) verze 1.0d 2003 srovnáním s databázovými údaji difraktogramů obsažených v databázi JCPDS PDF2 (International Centre for Diffraction Data<sup>®</sup>, U.S.A.). Kvantitativní analýza tablet analgetika byla počítána pomocí programu PowderCell for Windows, verze 8,4 2000, Germany [52].

### **2.2.5 Optická mikroskopie**

Tvar a velikost čistých látek a rozetřených tablet se určovaly optickým mikroskopem Olympus BX40 10X s digitálním zařízením Olympus DP12.

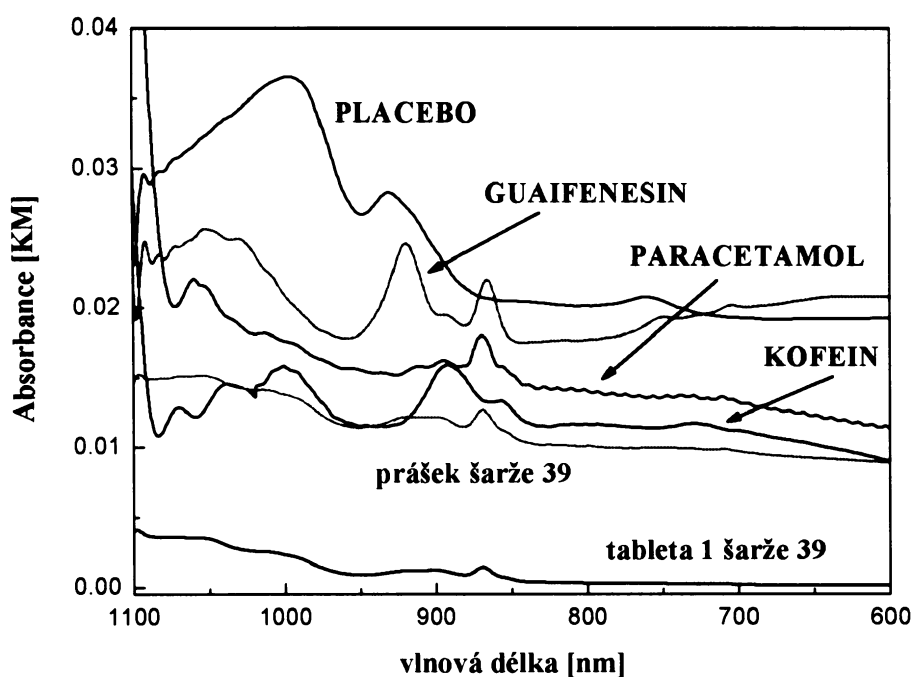
### **2.2.6 Zpracování dat**

- Origin Pro verze 7,0 (OriginLab, USA) ke grafickému zpracování dat a multilineární regresi
- Microsoft<sup>®</sup> Excel 2002 (Microsoft Corporation) ke grafickému a základnímu statistickému zpracování dat
- NCSS verze 6,0 (NCSS, USA) k multilineární regresi

### 3. Výsledky

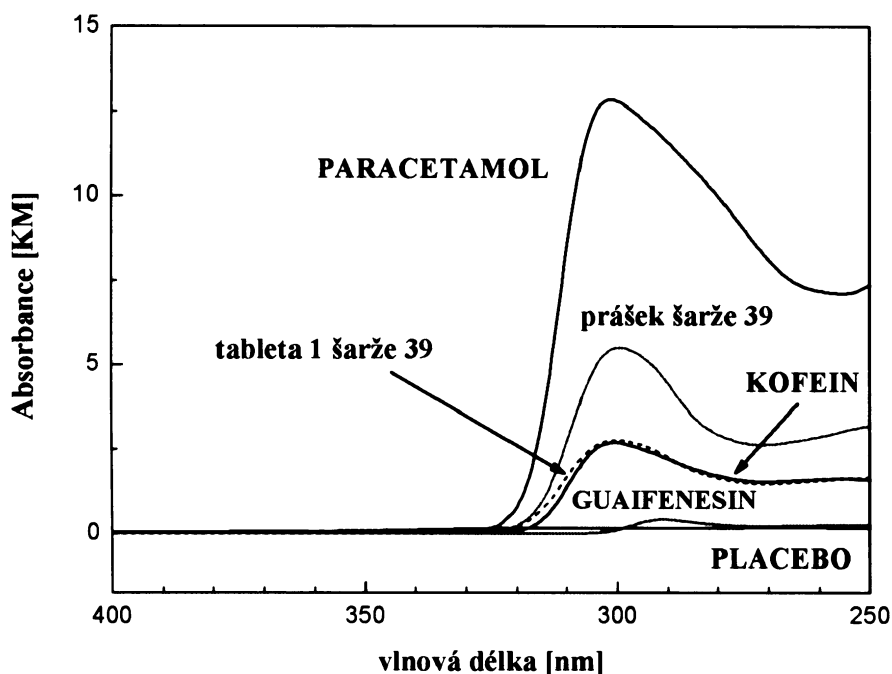
#### 3.1 Difúzně reflexní UV–Vis spektroskopie (DRS) pevného analgetika

Všechny reflektance získané při měření difúzně reflexních spekter jsem přepočítával na absorbanci vyjádřenou v jednotkách Kubelka-Munk (KM) podle rovnice 3 a dále jsem spektra zpracovával pomocí programu Origin Pro (OriginLab, USA). Analgetikum v pevném stavu absorbuje v oblasti 1100–800 nm, kde se nacházejí overtóny molekulových rotačně-vibračních přechodů OH skupin (viz obrázek 1), ovšem absorbance je velmi nízká. V oblasti spektra viditelného záření žádné absorpční pásy nejsou, což vychází ze vzhledu analgetika, které je bílé čili má mizivou absorbanci.



**Obrázek 1:** Difúzně reflexní spektrum čistých složek, pevného a rozetřeného analgetika v oblasti 1100–800 nm. Vyhlazeno 15ti bodovým FFT filtrem.

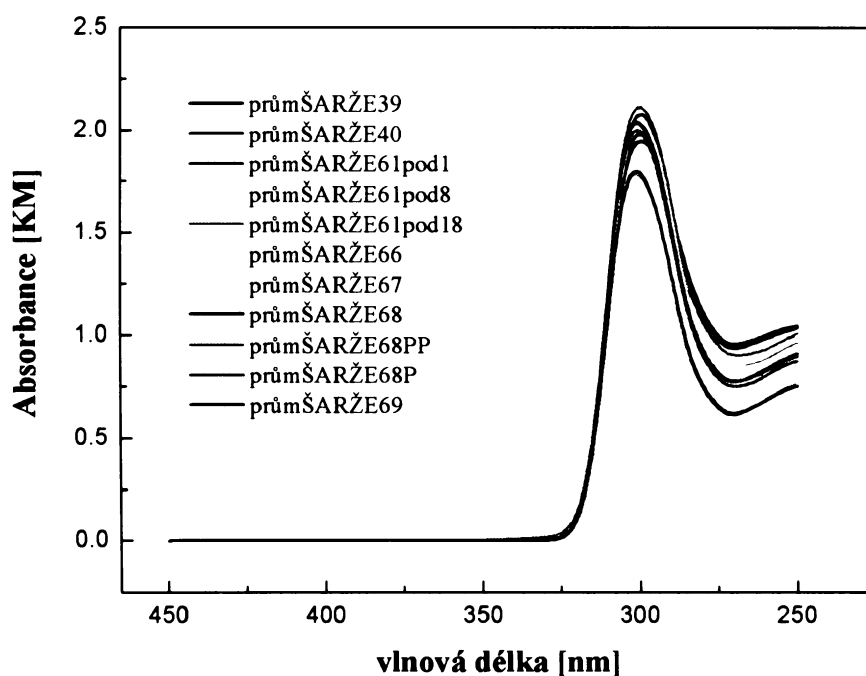
Daleko významnější je absorpce v UV oblasti (viz obrázek 2), ovšem absorpční maxima aktivních složek se takřka překrývají. Největší absorpenci má paracetamol, takže absorbance v maximu cca 12,8 KM bude patrně úměrná jeho relativní koncentraci. Výraznou absorpenci paracetamolu lze vysvětlit za pomoci tabulky 4 ze str. 10 v jeho struktuře dominují konjugované C=C vazby, které mají absorpční maximum právě v UV oblasti. Zároveň paracetamol je dominantní složka v analgetiku, čili změřená spektra analgetik vypovídají o pravděpodobném obsahu především paracetamolu a částečně kofeinu. Jakékoli “naředění” paracetamolu placebem nebo guaifenesinem by se tak mělo na celkové absorpenci v UV oblasti projevit.



**Obrázek 2:** Difúzně reflexní UV spektrum čistých práškových složek, pevného a rozetřeného analgetika. Vyhlazeno 15ti bodovým FFT filtrem.

Vliv formy pevného analgetika je patrný z rozdílu ve spektrech tablety a prášku získaného jejím rozetřením (viz obrázek 1 a 2). Podobné rozdíly podle formy pevného vzorku již byly popsány [26,27]. Z této citlivosti plyne riziko vlivu textury tablety na výsledek DRS, tj. vlivu kvality povrchu po vylisování.

Na obrázku 3 jsou srovnána spektra šarží analgetika, která jsem získal zprůměrováním vždy pěti nezávislých měření vždy deseti tablet pro každou šarž, které jsem vyhladil 15ti bodovým FFT filtrem. Rozdíly mezi šaržemi jsou patrně větší než možné kolísání složení mezi šaržemi (viz tabulka 5). Například šarže 66 má nápadně nízkou absorbanci v UV oblasti, ačkoli všechny šarže včetně čísla 66 vyhovovaly deklarovanému složení, tj. jejich průměrné složení muselo být do pěti relativních procent od nominální hodnoty zatímco průměrná absorbance šarže 66 je o necelých 20 % menší než průměrná absorbance všech šarží. Ukazuje to ale na citlivost DRS k rozdílům mezi způsobem míchání šarží nebo lisováním tablet.



**Obrázek 3:** Difúzně reflexní UV spektrum šarží analgetika. Vyhlazeno 15ti bodovým FFT filtrem.



**Tabulka 5:** Absorbční maximum pevné lékové formy při DRS v UV oblasti. Vyhlazeno 15ti bodovým FFT filtrem.

Číslo šarže	Absorbční maximum průměr [nm]	Maximální absorbance [KM] (pro n = 50)	R.S.D (%) (pro n = 50)
39	299	1,95	4,4
40	299	1,98	4,7
61 podšarže 1	299	2,08	3,4
61 podšarže 8	299	2,03	1,9
61 podšarže 18	299	2,11	7,1
66	299	1,59	4,3
67	300	1,77	3,8
69	300	1,80	3,7
68	300	2,04	3,7
68 PP	300	2,00	1,8
68 P	300	2,03	2,2
průměr		1,94	3,7
R.S.D. (%)		7,8	

Pozn.: R.S.D. je relativní směrodatná odchylka uvedená v procentech.

Protože se tak značně liší DRS absorbance tablet a prášků z nich získaných, nebylo možné vyrobit kalibrační směsi pro kvantitativní analýzu DRS tablet analgetika. Bohužel DRS absorbance nejsou přímo úměrné koncentraci složek, takže je nejisté, zda by podobná kalibrace vůbec měla smysl.

Tabulka 6: Analýza přesnosti DRS měření pevné lékové formy šarže 39 v UV oblasti.

Číslo tablety	Absorbční maximum průměr [nm]	Maximální absorbance [KM] (pro n = 5)	R.S.D. (%) (pro n = 5)
1	300	2,16	2,1
2	300	2,00	2,3
3	299	1,93	0,9
4	299	1,86	1,9
5	298	2,01	1,5
6	299	1,93	2,2
7	299	1,95	1,9
8	299	1,88	2,1
9	299	1,89	2,8
10	299	1,87	2,7
průměr		1,95	2,0
R.S.D. (%)		4,4	

Pozn.: R.S.D. je relativní směrodatná odchylka uvedená v procentech.

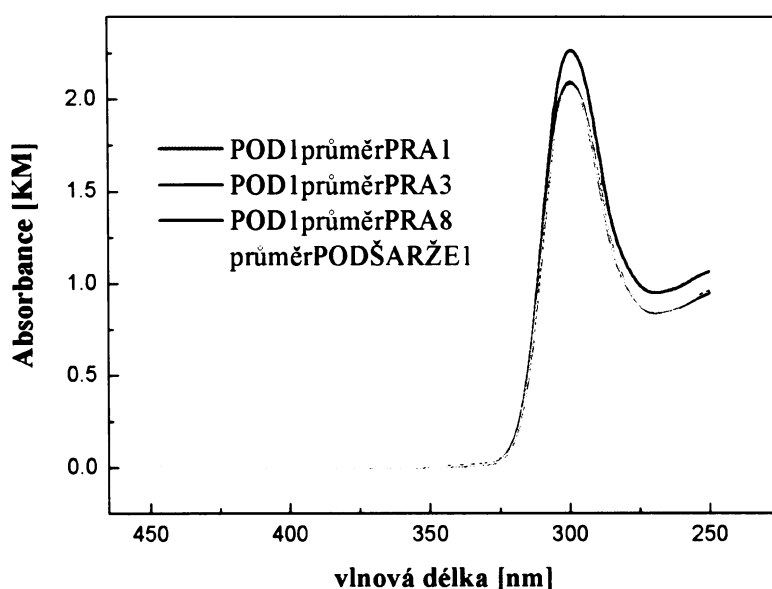
Tabulka 6 ukazuje přesnost měření DRS absorbance v UV oblasti získanou zprůměrováním vždy celkem pěti nahodile provedených nezávislých měření pro každou z deseti tablet jedné šarže s cílem odhadnout přesnost samotného měření spektra. Ta je závislá na přesném umístění tablety do měřicího okna spektrometru, která není tak přesně justována jako při měření v konvenčních kyvetách. Přesnost měření (průměrná R.S.D. je 2,0 %) je lepší než průměrná celková variance složení (R.S.D. 4,4%) v rámci celé šarže. Jedním z možných výsledků DRS totiž může být zjištění, jestli v souboru tablet v šarži není případ tablety se zcela atypickými vlastnostmi, danými například nedostatečnou homogenizací směsi analgetika před lisováním lékové formy.

Test odlehlosti výsledků vycházejícího z dat uvedených v tabulce 6 jsem provedl podle Dean–Dixonova testu (rovnice 5):

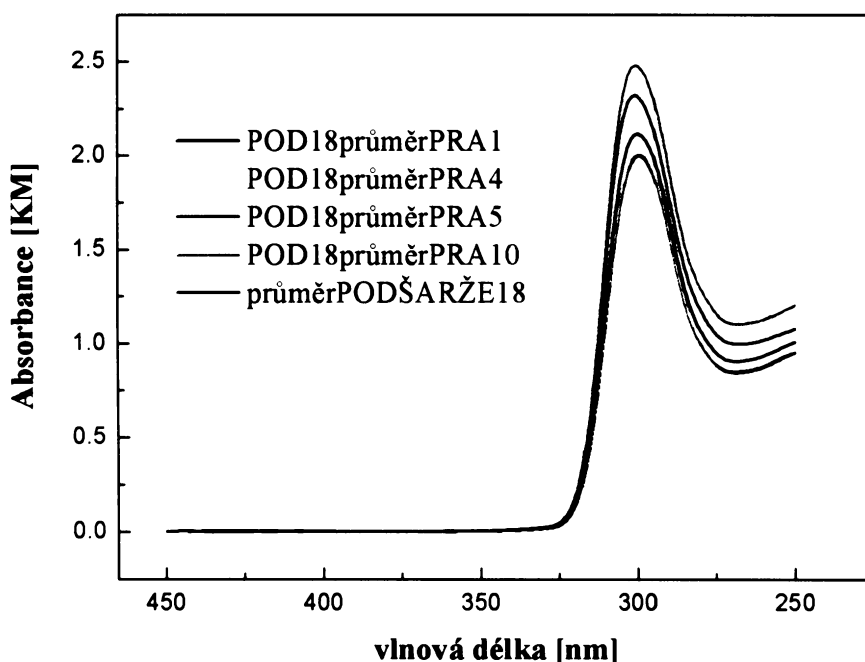
$$Q_k = \frac{X_{\max} - X_{\max-1}}{X_{\max} - X_{\min}} \quad (\text{rovnice 5})$$

dle rovnice 5 vyšla hodnota  $Q_k$  0,5 pro výsledek absorbance tablety 1 ( $X_{\max} = 2,16$  KM) a tablety 5 ( $X_{\max-1} = 2,01$  KM), což je velice blízko kritické hodnotě  $Q_k$  0,527 na hladině významnosti  $\alpha = 0,05$  pro počet měření  $n = 10$  [53]. To znamená, že DRS je schopná identifikovat v šarži tablety s extrémním složením, což může být užitečné při hodnocení obsahové stejnoměrnosti léčiva.

Na obrázku 4 a 5 je ukázána odlišnost naměřených spekter v rámci šarže 61 podšarže 1 a v rámci šarže 61 podšarže 18. Všechny uvedené tablety obou šarží se dále použily už jako rozetřený prášek k měření IR spektroskopie a zbytek byl dodán do laboratoří firmy Zentiva k analýze vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií (HPLC) s cílem ověřit hypotézu, že DRS může odhalit tablety s extrémním složením, tj. podezřelé z obsahové nestejnoměrnosti. Spektrum šarže 61 průměru podšarže 1 a 18 vzniklo zprůměrováním pěti nezávislých měření deseti tablet analgetika.



**Obrázek 4:** Ukázka odlišnosti mezi naměřenými difúzně reflexními UV spektry v rámci měření tablet šarže 61 podšarže 1. Vyhlazeno 15ti bodovým filtrem, zobrazeno je spektrum s extrémní hodnotou absorbance.



Obrázek 5: Ukázka odlišnosti mezi naměřenými difúzně reflexními UV spektry v rámci měření tablet šarže 61 podšarže 18. Vyhlazeno 15ti bodovým FFT filtrem, zobrazena jsou spektra s extrémními hodnotami absorbance.

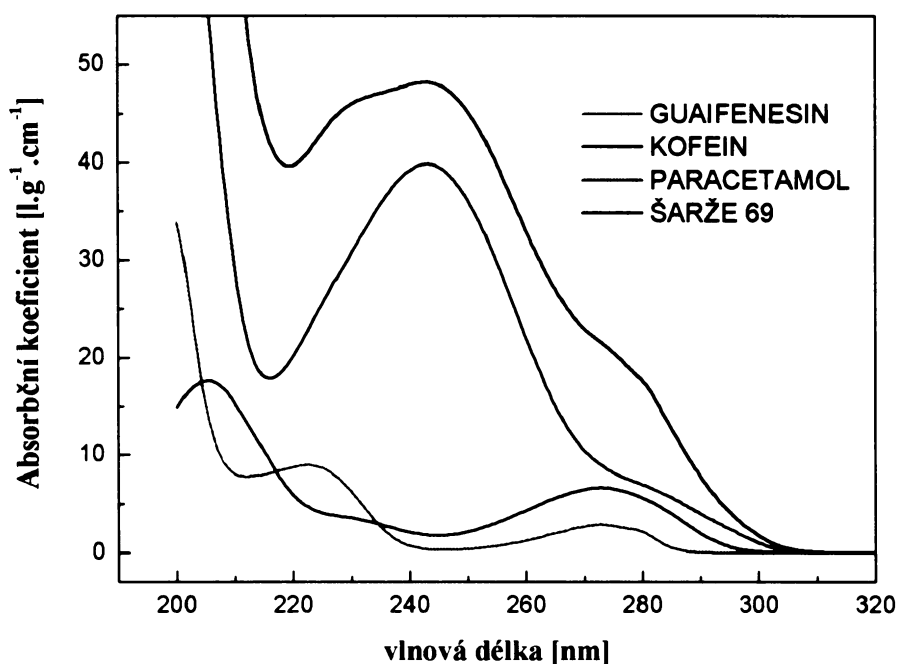
Difúzně reflexní měření léčiva ve formě tablet má hned několik výhod. Jedná se o nedestruktivní a neinvazivní měření, čímž je zminimalizována pracnost celého měření. Další výhodou, která se uplatnila i v této diplomové práci, je možnost další analýzy tablet nezávislou metodou. Tablety po měření difúzně reflexní spektroskopii jsou zcela neporušené, v původním stavu a jsou ihned připravené k měřením pomocí dalších analytických metod. A samozřejmě je důležité zmínit schopnost difúzně reflexní spektroskopie vyhledávat tablety s extrémním složením a pracovat rychle třeba i s velkými soubory vzorků.

### 3.2 Konvenční UV–Vis spektroskopie roztoků

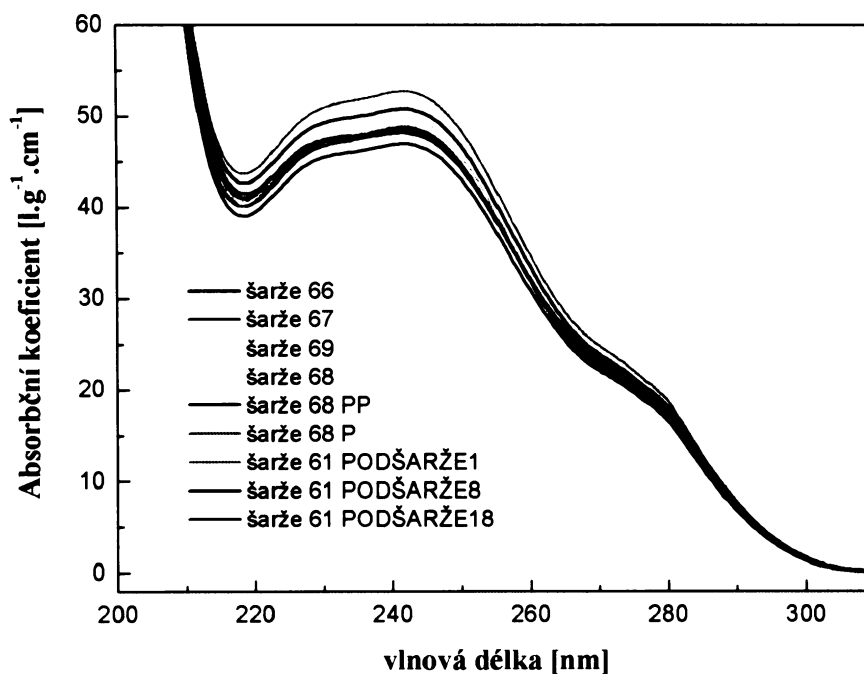
Jedna z možností analýzy složení analgetika je UV spektroskopie jeho roztoku. Kvantitativní analýza byla provedena po rozpuštění vzorků analgetika změřením UV spektra roztoků a následnou multilineární regresí v oblasti vlnových délek 215,5–450 nm pomocí spekter roztoku čistých složek. Podobný postup pro kvantitativní analýzu léčiva ve formě sirupu a rozpuštěné pevné lékové formy použili Blanco et al. [54, 55]. Absorbance byly spočteny pomocí rovnice 2. Pomocné látky (placebo) v UV oblasti neabsorbovaly, protože jde většinou o alifatické sloučeniny.

Spektrum DRS pevných látek a roztoků se liší (viz obrázek 2 ve srovnání s obrázkem 6). Jde jistě o vliv solvatace složek. Například jediné maximum s vlnovou délkou cca 300 nm absorbance pevné lékové formy se po rozpuštění jakoby rozdělilo na několik maxim v rozmezí vlnových délek 220 až 300 nm.

UV spektra jednotlivých šarží se po rozpuštění lišily (viz obrázek 7). Výsledek zpracování spekter multilineární regresí těchto šarží je uveden v tabulce 7. Roztok každé šarže byl připraven z navážky 5ti rozetřených tablet, takže charakterizuje vždy průměr celé šarže. Výsledky vychází pouze z 1 roztoku z každé průměrné šarže a pouze z 1 měření, takže nelze odhadnout chybu měření. Hlavní význam má zjištěný průměr aktivních složek všech šarží. Největší absorbanci roztoku v UV oblasti má paracetamol. V UV oblasti dominují  $n-\pi$  a  $\pi-\pi^*$  elektronové přechody (viz tabulka 4 na str.10), které mají absorpční maxima právě v UV oblasti. Příslušné chromofory jsou nejvíc zastoupeny právě v molekule paracetamolu, takže jeho absorbance v UV oblasti je největší.



Obrázek 6: UV spektrum roztoku čistých složek analgetika, na ose y je vynesena absorbční koeficient. Absorbční koeficient čistých složek byl vynásoben jejich hmotnostními zlomky v sumě aktivních složek analgetika.



Obrázek 7: UV spektrum roztoků průměrných vzorků ze všech šarží analgetika.

Regresní koeficienty po multilineární regresi jsem normalizoval na 1 a výsledek v tabulce 7 jsem vyjádřil v procentuálním zastoupení aktivních složek.

Výsledky po multilineární regresi jsou v dobrém souladu s deklarovaným (nominálním) složením. Rozdíl mezi výsledky po multilineární regresi a deklarovaným složením se liší o 3,9 rel.% u guaifenesinu, o 0,4 rel.% u kofeinu a 1,5 rel.% u paracetamolu.

Výsledky multilineární regrese zpracovaných UV spekter roztoku tedy považuji za použitelný odhad průměrného složení celé šarže. Výsledná průměrná variance složení šarží je velmi nízká ( $R.S.D. \leq 4$  rel.%), což je v souladu s očekávanou dobrou shodou skutečného a deklarovaného (nominálního) složení analgetika a je v souladu s přísným požadavkem norem na dodržení obsahu aktivních složek.

Tabulka 7: Průměrná složení šarží zjištěná UV-Vis spektroskopii. Výsledek multilineární regrese v oblasti 215,5–450 nm po měření roztoku analgetika.

Číslo šarže	Guaifenesin	Kofein	Paracetamol
	% aktivních složek		
průměr 66	26,2	13,6	60,2
průměr 67	25,5	13,5	61,0
průměr 69	24,8	13,3	61,9
průměr 68	25,7	12,3	62,0
průměr 68 PP	25,7	13,3	61,0
průměr 68 P	25,9	12,5	61,6
61 podšarže 1 průměr	25,2	13,5	61,3
61 podšarže 8 průměr	26,1	13,2	60,7
61 podšarže 18 průměr	26,8	14,1	59,1
průměr	<b>25,8</b>	<b>13,2</b>	<b>61,0</b>
prům. system. chyba (%)	3,9	-0,4	-1,5
R.S.D. (%)	2,1	4,0	1,4
nominální hodnota	<b>24,8</b>	<b>13,3</b>	<b>61,9</b>

Pozn.: Průměrná systematická chyba je vyjádřena jako průměrný rozdíl mezi nalezeným a deklarovaným složením a R.S.D. (%) je relativní směrodatná odchylka.

Metodu UV spektroskopie s multilineární regresí jsem použil k analýze vybraných tablet ze tří podšarží šarže 61. Výsledky (viz tabulka 8–10) jsem pak použil ke korelaci výsledků jednotlivých metod v rámci této šarže. Přesnost a správnost výsledkově uvedené v tabulkách 8 až 10 jako průměrná systematická chyba a relativní směrodatná odchylka se příliš nelišily od analýzy průměru celých šarží (viz tabulka 7).

**Tabulka 8:** Průměrné složení uvnitř šarže 61 podšarže 1 podle UV–Vis spektroskopie roztoku. Výsledek multilineární regrese v oblasti 215,5–450 nm po měření roztoku analgetika.

Číslo tablety	Guaifenesin	Kofein	Paracetamol
	% aktivních složek		
2	25,5	13,8	60,7
4	26,2	14,0	59,8
5	26,1	13,4	60,5
6	24,0	13,4	62,7
7	24,3	13,2	62,5
průměr	<b>25,2</b>	<b>13,5</b>	<b>61,3</b>
prům. system. chyba (%)	1,6	1,9	-1,0
R.S.D. (%)	3,6	2,3	1,9
nominální hodnota	<b>24,8</b>	<b>13,3</b>	<b>61,9</b>

Pozn.: Průměrná systematická chyba je vyjádřena jako průměrný rozdíl mezi nalezeným a deklarovaným složením a R.S.D. (%) je relativní směrodatná odchylka.



Tabulka 9: Průměrné složení uvnitř šarže 61 podšarže 8 při UV–Vis spektroskopie roztoku. Výsledek multilineární regrese v oblasti 215,5–450 nm po měření roztoku analgetika.

Číslo tablety	Guaifenesin	Kofein	Paracetamol
	% aktivních složek		
2	25,9	13,3	60,8
3	27,5	13,1	59,4
6	26,3	12,8	60,9
9	24,7	13,4	61,9
10	26,0	13,6	60,4
průměr	<b>26,1</b>	<b>13,2</b>	<b>60,7</b>
prům. system. chyba (%)	5,2	-0,8	-1,9
R.S.D. (%)	3,4	2,1	1,3
nominální hodnota	<b>24,8</b>	<b>13,3</b>	<b>61,9</b>

Pozn.: Průměrná systematická chyba je vyjádřena jako průměrný rozdíl mezi nalezeným a deklarovaným složením a R.S.D. (%) je relativní směrodatná odchylka.

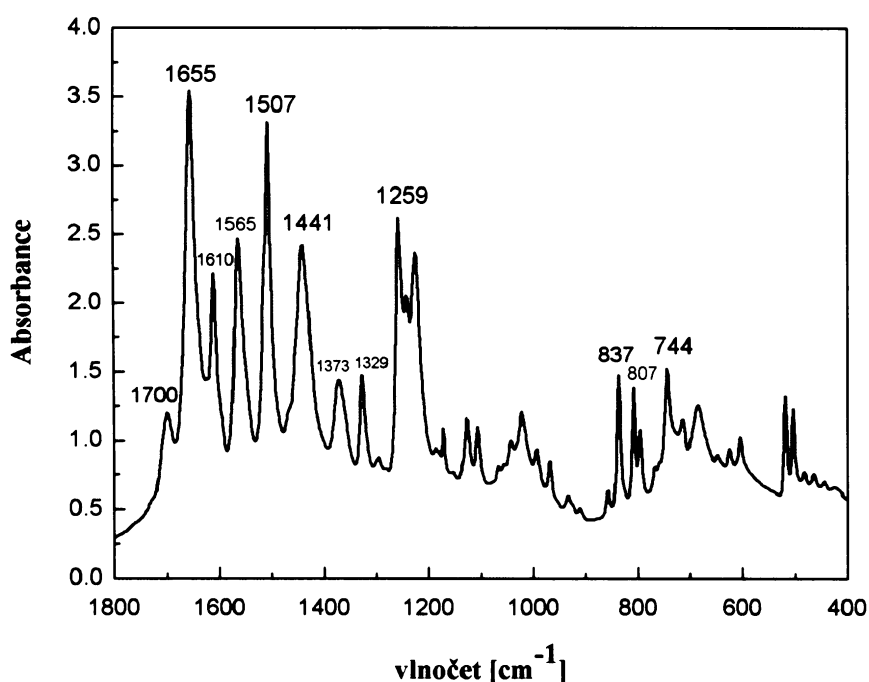
Tabulka 10: Průměrné složení uvnitř šarže 61 podšarže 18 při UV–Vis spektroskopie roztoku. Výsledek multilineární regrese v oblasti 215,5–450 nm po měření roztoku analgetika.

Číslo tablety	Guaifenesin	Kofein	Paracetamol
	% aktivních složek		
1	26,7	13,9	59,4
3	27,4	14,2	58,4
6	26,9	14,1	59,0
9	26,1	14,2	59,7
průměr	<b>26,8</b>	<b>14,1</b>	<b>59,1</b>
prům. system. chyba (%)	8,1	6,0	-4,5
R.S.D. (%)	1,7	0,9	0,8
nominální hodnota	<b>24,8</b>	<b>13,3</b>	<b>61,9</b>

Pozn.: Průměrná systematická chyba je vyjádřena jako průměrný rozdíl mezi nalezeným a deklarovaným složením a R.S.D. (%) je relativní směrodatná odchylka.

### 3.3 IR spektroskopie

Překryv pásů čistých složek v UV oblasti při měření tablet difúzně reflexní spektroskopií a částečný překryv roztoků čistých složek v UV oblasti při konvenční UV spektroskopii se při měření čistých složek v KBr tabletě též částečně projevil, ale v měřené oblasti  $4000\text{ cm}^{-1}$  až  $400\text{ cm}^{-1}$  je dosti izolovaných pásů jednotlivých složek. Proto jsem se pokusil o kvantitativní analýzu analgetika zpracováním infračerveného spektra. Jak jsem zmiňoval v teoretickém úvodu pro kvantitativní analýzu, v IR oblasti se stejně jako u kvantitativní analýzy konvenční UV–Vis spektroskopie použila multilineární regrese (MLR) u části nebo celého spektra [39,40].

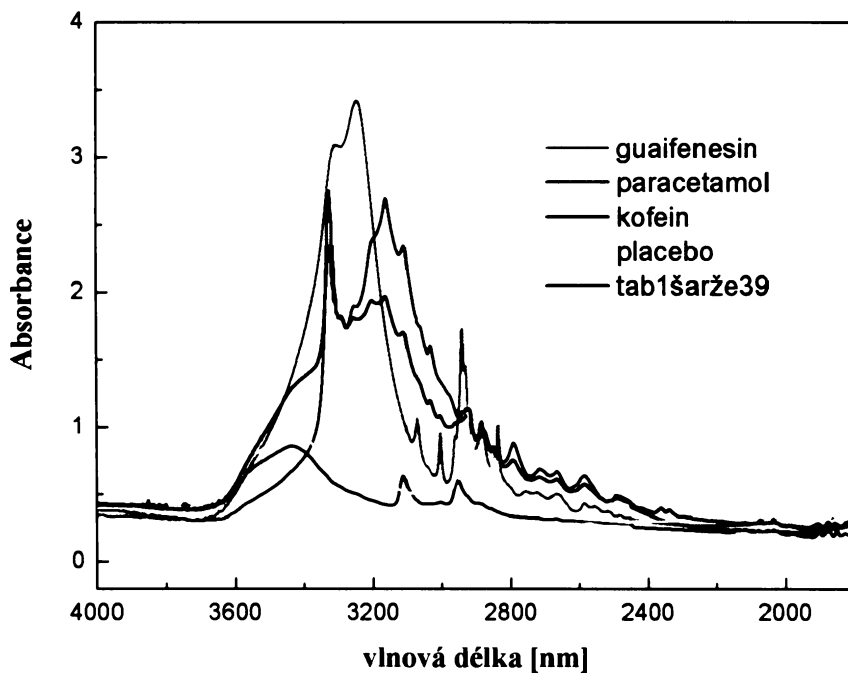


Obrázek 8: IR spektrum analgetika v oblasti vlnočtů  $1800\text{--}400\text{ cm}^{-1}$ .

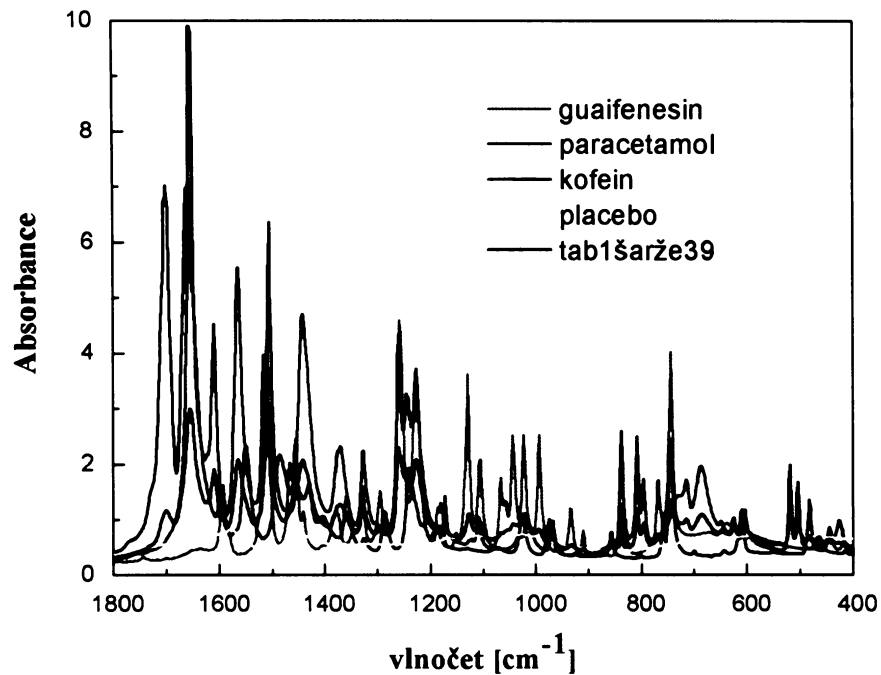
**Tabulka 11:** Přibližné přiřazení pásů analgetika v IR spektru pomocí programu EZ Omnic E.S.P. 7.2 a zdrojů [56,57].

Vlnočty vybraných pásů [ $\text{cm}^{-1}$ ]	Pravděpodobná skupina a typ vibrace
1700 a 1655	valenční vibrace C=O a vibrace amidického pásu konkrétně $\nu(\text{C=O})+\delta(\text{NH})$
1610	deformační vibrace $\text{NH}_2$
1565 a 1507	valenční vibrace CC vazeb aromatického kruhu
1441	deformační vibrace skupin $\delta(\text{CH}_3)$ a $\delta(\text{CH}_2)$
1373, 1329 a 1259	valenční vibrace C–O od OH skupin
837, 808 a 744	mimorovinné deformační vibrace aromatických C–H vazeb

Na obrázku 8 je spektrum analgetika s popisem výrazných pásů (viz tabulka 11). Při kvantitativní IR analýze analgetika se vybrala vhodná oblast pro multilineární regresi, konkrétně  $400\text{--}1446,4\text{ cm}^{-1}$ . Tuto oblast jsem zvolil z několika důvodů. Jak je vidět na obrázku 9, v oblasti od  $4000\text{ cm}^{-1}$  do  $1800\text{ cm}^{-1}$  je velký vliv vody, která vytváří “bouli”, širokou absorpci kolem  $3500\text{ cm}^{-1}$ , proto nebyla oblast vyšších vlnočtů použita. Dalším špatným vlivem pro správnou regresi je oblast při  $1655\text{ cm}^{-1}$ , kde se vyskytují velice intenzivní absorpce C = O od paracetamolu a též kofeinu z amidových skupin. Tato oblast byla též vyloučena z dalšího zpracování, aby analytické absorpční pásy složek měly zhruba stejnou absorbanci. Proto jsem tedy pro multilineární regresi vybral oblast  $400\text{--}1446,4\text{ cm}^{-1}$ , kde  $400\text{ cm}^{-1}$  je začátek spektra a  $1446,4\text{ cm}^{-1}$  je sedlo mezi dvěma pásy  $1441$  a  $1507\text{ cm}^{-1}$  (viz obrázek 8). V této vybrané oblasti mají čisté látky dostatek separovaných a dostatečně intenzivních pásů (viz obrázek 10). Dalším důvodem omezení rozsahu IR spektra k regresní analýze bylo zmenšení vlivu základní linie, jejíž tvar v celém spektru není nijak lineární.



Obrázek 9: IR spektrum čistých složek, placebo a analgetika v oblasti vlnočtů 4000–1800  $\text{cm}^{-1}$ .



Obrázek 10: IR spektrum čistých složek, placebo a analgetika v oblasti vlnočtů 1800–400  $\text{cm}^{-1}$ .

K ověření IR spektroskopie ve vybrané oblasti a zpracování multilineární regresi se použily modelové směsi s obsahem guaifenesinu (vzorky ATASYN1–5) a kofeinu (vzorky ATASYN6–10) v intervalu kolísajícím o 2 až 4 % (přepočtených na obsah aktivních látek) od deklarovaného složení (viz tabulka 12 a 13). Obsah placebo byl konstantní, tzn. podle deklarovaného složení.

Při multilineární regresi se nejprve použil program Origin, který pracoval se všemi aktivními složkami a placebem. Výsledek po regresi vycházel se statisticky nevýznamnou konstantou. Proto se použil program NCSS, kde je možno konstantu vyloučit. Nicméně regresní koeficient placebo pak vzrostl na nerealisticky vysokou hodnotu. Placebo navíc nemá významné IR pásy (viz obrázek 9 a 10), proto nebylo zahrnuto do výpočtu koncentrací složek po zpracování spekter multilineární regresi, protože. Bylo sice použito jako jedna ze čtyř složek při multilineární regresi, ale jeho regresní koeficient byl nerealisticky vysoký a spíše nahrazoval zvýšené pozadí spektra vzorků, protože reálné vzorky směsi včetně tablet analgetika měly v IR spektrech nespécificky zvýšenou absorpci (tzv. haló).

**Tabulka 12:** Navážky modelových směsí připravených z čistých složek a placebo, obsah guaifenesinu (ATASYN1–5) a kofeinu (ATASYN6–10) kolísal v intervalu o 2 – 4 % přepočtených na obsah aktivních látek.

Číslo modelové směsi	Guaifenesin [mg]	Kofein [mg]	Paracetamol [mg]	Placebo [mg]
AtaSyn1	109,9	73,7	341,4	65,2
AtaSyn2	120,2	71,8	333,6	66,2
AtaSyn3	131,3	69,9	325,7	65,3
AtaSyn4	140,4	68,6	317,4	66,5
AtaSyn5	150,3	68,0	308,6	65,2
AtaSyn6	134,6	55,3	336,0	65,3
AtaSyn7	132,1	62,5	330,4	66,6
AtaSyn8	130,4	70,5	325,0	65,1
AtaSyn9	127,8	77,8	319,4	65,1
AtaSyn10	126,0	85,2	314,5	65,0

**Tabulka 13:** Relativní zastoupení aktivních složek v modelových směsí připravených z čistých složek a placebo, obsah guaifenesinu (ATASYN1–5) a kofeinu (ATASYN6–10) kolísal v intervalu o 2 – 4 % přepočtených na obsah aktivních látek.

Číslo modelové směsi	Guaifenesin	Kofein	Paracetamol
	% aktivních složek		
AtaSyn1	<b>21,0</b>	14,0	65,0
AtaSyn2	<b>22,9</b>	13,6	63,5
AtaSyn3	<b>24,9</b>	13,3	61,8
AtaSyn4	<b>26,7</b>	13,0	60,3
AtaSyn5	<b>28,5</b>	12,9	58,6
AtaSyn6	25,6	<b>10,5</b>	63,9
AtaSyn7	25,2	<b>11,9</b>	62,9
AtaSyn8	24,8	<b>13,4</b>	61,8
AtaSyn9	24,4	<b>14,8</b>	60,8
AtaSyn10	24,0	<b>16,2</b>	59,8

Výsledek zpracování infračervených spekter modelových směsí multilineární regresi je uveden v tabulce 14 a 15. Příslušné kalibrační křivky pro obsah guaifenesinu a kofeinu jsou na obrázcích 11 a 12.

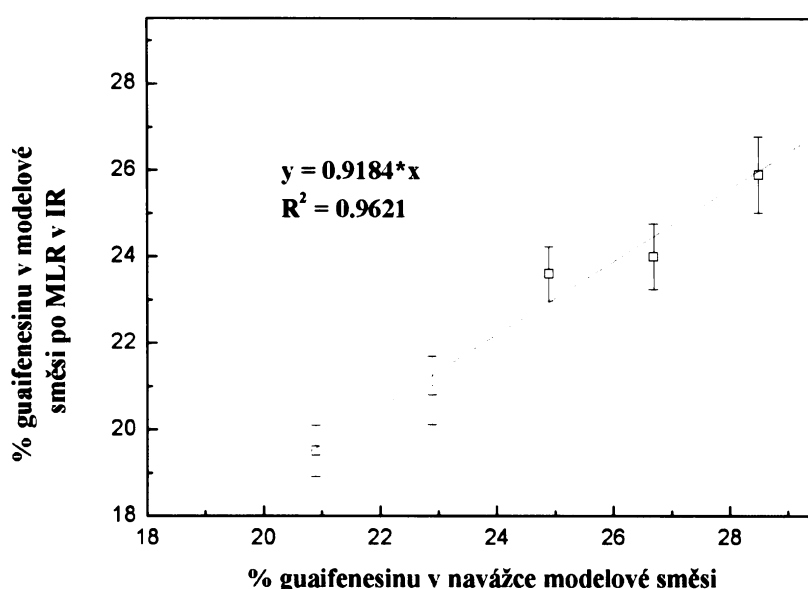
Infračervenou spektroskopii s multilineární regresi jsem pak použil na průměrnou analýzu celých šarží. K multilineární regresi, jejíž výsledky jsou uvedeny v tabulce 16, jsem zprůměroval vždy spektra tří nezávislých měření 10ti tablet. Bohužel systematická chyba analýzy IR s multilineární regresi byla větší než celková variance v rámci šarže (relativní směrodatná odchylka), čili metoda poskytuje systematicky nesprávné výsledky.

Infračervená spektroskopie v kombinaci s multilineární regresi dává systematicky větší výsledek pro kofein a guaifenesin. V případě kofeinu je to v souladu se systematickou chybou z kalibrace (viz obrázek 12), takže možná bylo spektrum čistého kofeinu nesprávně změřeno. Mohlo jít o vliv velikosti částic nebo celkovou vlastnost KBr tablety se směsí ve srovnání s čistou složkou. U guaifenesinu je kladná

systematická chyba v analgetiku a záporná systematická chyba v kalibraci (viz obrázek 11). Tento nesoulad by mohl souviset s vlivem rozetření analytu do KBr tablety. Přípravě KBr tablety pro IR spektroskopii by bylo třeba v další práci věnovat mnohem větší pozornost, protože patrně jde o hlavní slabinu této metody. Chyby měření a multilineární regrese (MLR) jsou shrnuty v tabulce 17 na příkladu analýzy šarže 61. Výsledky pro jednu tabletu jsou zprůměrovány vždy ze tří nezávislých měření.

**Tabulka 14:** Výsledek analýzy modelové směsi po IR spektroskopii s multilineární regresí v oblasti 400–1446,4 cm<sup>-1</sup> pro validaci analýzy guaifenesinu.

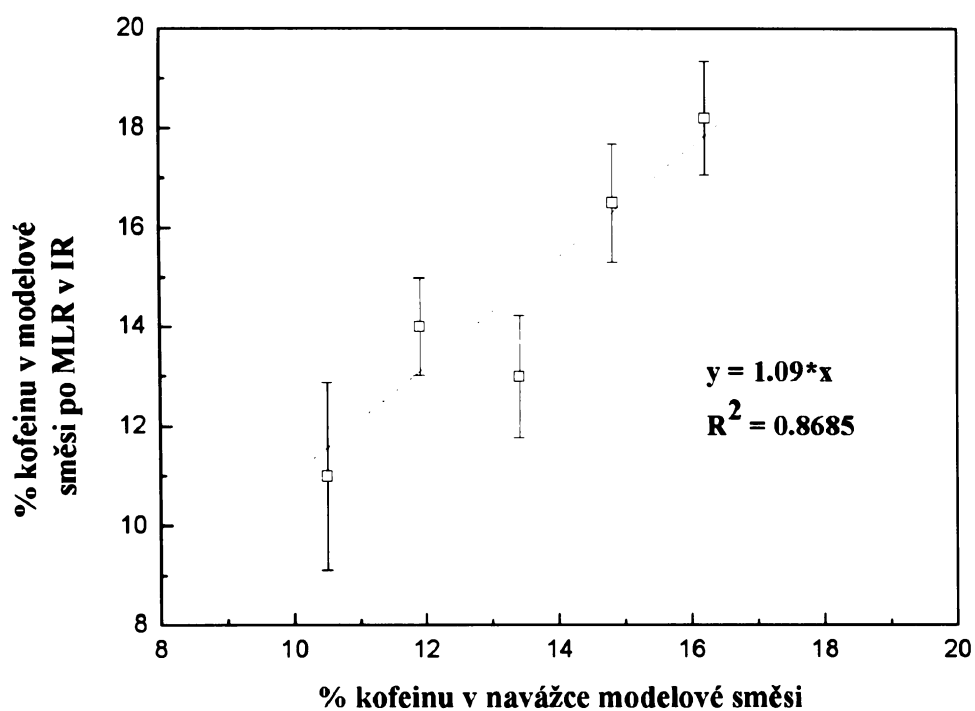
Číslo modelové směsi	Guaifenesin	Kofein	Paracetamol
	% aktivních složek		
AtaSyn1	19,5	14,8	65,7
AtaSyn2	20,9	16,3	62,8
AtaSyn3	23,6	14,9	61,5
AtaSyn4	24,0	12,0	64,0
AtaSyn5	25,9	13,6	60,5



**Obrázek 11:** Kalibrační přímka modelové směsi s měnícím se obsahem guaifenesinu.

**Tabulka 15:** Výsledek analýzy modelové směsi po IR spektroskopii s multilineární regresi v oblasti 400–1446,4 cm<sup>-1</sup> pro validaci analýzy kofeinu.

Číslo modelové směsi	Guaifenesin	Kofein	Paracetamol
	% aktivních složek		
AtaSyn6	24,2	<b>11,0</b>	64,8
AtaSyn7	24,9	<b>14,0</b>	61,1
AtaSyn8	26,3	<b>13,0</b>	60,7
AtaSyn9	23,5	<b>16,5</b>	60,0
AtaSyn10	25,2	<b>18,2</b>	56,6



**Obrázek 12:** Kalibrační přímka modelové směsi s měnícím se kofeinem.



**Tabulka 16:** Průměrná složení šarží zjištěná IR spektroskopii a multilineární regresí v oblasti 400–1446,4 cm<sup>-1</sup> při měření KBr tablet s analgetikem. Regresní koeficienty jsou přepočítány na procentuální obsah aktivních složek analgetika.

Číslo šarže	Guaifenesin	Kofein	Paracetamol
	% aktivních složek		
39	25,6	17,8	56,6
40	24,9	17,7	57,4
61 podšarže 1	28,6	15,3	56,1
61 podšarže 8	27,9	16,0	56,1
61 podšarže 18	28,7	17,5	53,8
61 podšarže 1 z DRS	25,8	14,1	60,1
61 podšarže 8 z DRS	26,3	13,3	60,4
61 podšarže 18 z DRS	26,6	15,0	58,4
66	24,5	16,2	59,3
67	25,3	15,0	59,7
69	27,6	11,9	60,5
68	25,7	14,2	60,1
68 PP	27,4	12,9	59,7
68 P	27,9	12,0	60,1
průměr	<b>26,6</b>	<b>14,9</b>	<b>58,5</b>
prům. system. chyba (%)	7,3	12,0	-5,5
R.S.D. (%)	5,0	12,8	3,5
nominální hodnota	<b>24,8</b>	<b>13,3</b>	<b>61,9</b>

Pozn.: Průměrná systematická chyba je vyjádřena jako průměrný rozdíl mezi nalezeným a deklarovaným složením a R.S.D. (%) je relativní směrodatná odchylka.

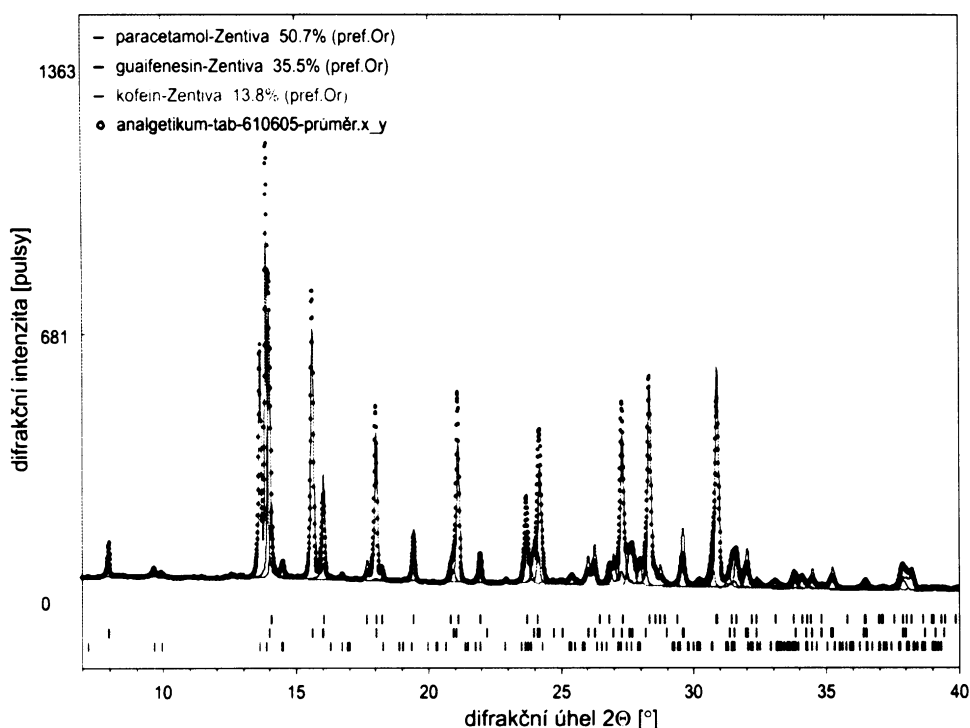
Tabulka 17: Průměrné složení v rámci šarže 61 podšarže 8 získané IR spektroskopii a multilineární regresi v oblasti 400–1446,4 cm<sup>-1</sup> při měření KBr tablet s analgetikem. Regresní koeficienty jsou přepočítány na procentuální obsah aktivních složek analgetika.

Číslo tablety	Guaifenesin		Kofein		Paracetamol	
	průměr	R.S.D.	průměr	R.S.D.	průměr	R.S.D.
1	25,2	2,5	12,9	7,4	61,9	2,1
2	25,8	5,7	14,4	7,4	59,8	3,8
3	27,2	4,7	13,7	8,2	59,1	3,2
4	26,1	4,7	14,0	5,4	59,9	3,2
5	26,4	1,8	11,6	5,8	62,0	1,7
6	27,9	1,5	13,3	1,1	58,8	1,0
7	25,8	3,6	13,0	5,6	61,2	2,7
8	27,4	3,1	15,4	6,0	57,2	3,0
9	25,7	3,5	12,9	4,6	61,4	2,2
10	25,6	6,3	13,0	6,6	61,4	4,0
průměr	<b>26,3</b>	<b>3,7</b>	<b>13,4</b>	<b>5,8</b>	<b>60,3</b>	<b>2,7</b>
prům. system. chyba (%)	6,0		0,8		-2,6	
R.S.D. (%)	3,2		7,3		2,5	
nominální hodnota	<b>24,8</b>		<b>13,3</b>		<b>61,9</b>	

Pozn.: Průměrná systematická chyba je vyjádřena jako průměrný rozdíl mezi nalezeným a deklarovaným složením a R.S.D. (%) je relativní směrodatná odchylka.

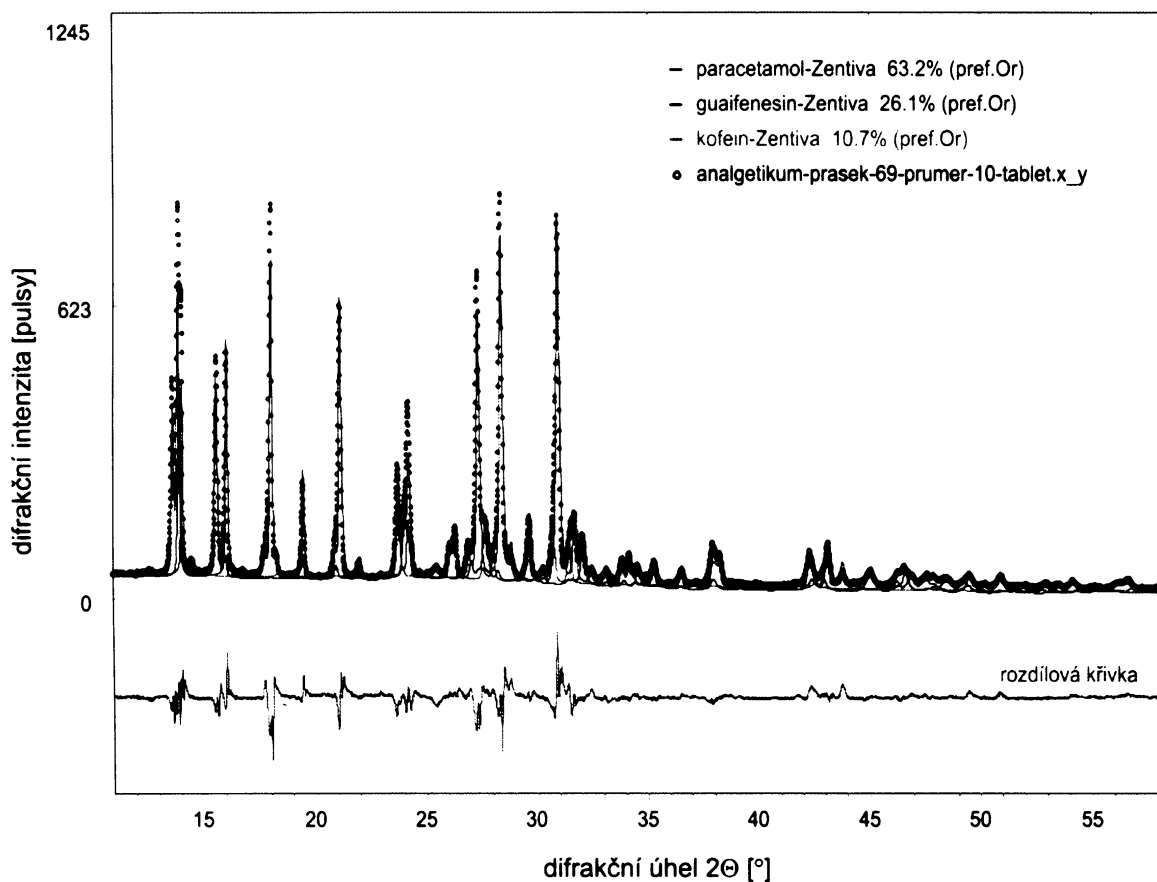
### 3.4 RTG prášková difrakce (XRD)

Při zpracování RTG práškových difraktogramů jsem pracoval s programem PowderCell. Zpracování celého difraktogramu (*full profile fitting* nebo *whole powder pattern processing*) vyžaduje informace o struktuře všech složek, tj. informace o prostorové symetrii krystalů, velikosti jednotkové buňky a příslušnou tabulku souřadnic všech difraktujících atomů (viz teoretický úvod). Příklad této vstupní informace je v tabulce 18 se strukturními údaji paracetamolu. Pro zadání do programů pro zpracování celého difraktogramu jsou potřebné údaje o prostorové grupě symetrie, parametry krystalové buňky ( $a$ ,  $b$ ,  $c$ ,  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ), a redukované souřadnice všech nezávislých atomových pozic. Z těchto údajů generuje program příslušný difraktogram, násobí jeho intenzitu tzv. škálovým faktorem, vypřesňuje velikosti krystalové buňky a tvar difrakčních linií pomocí profilových funkcí. V programu PowderCell se k tomu používá volba funkce profilu linie – použil jsem pseudo-Voigtovu funkci a tři profilových parametrů  $U$ ,  $V$ , a  $W$ , z nichž jsem většinou vypřesňoval jen  $W$ .



**Obrázek 13:** Difraktogram pevných tablet analgetika s přiřazením difrakcí jednotlivým složkám.

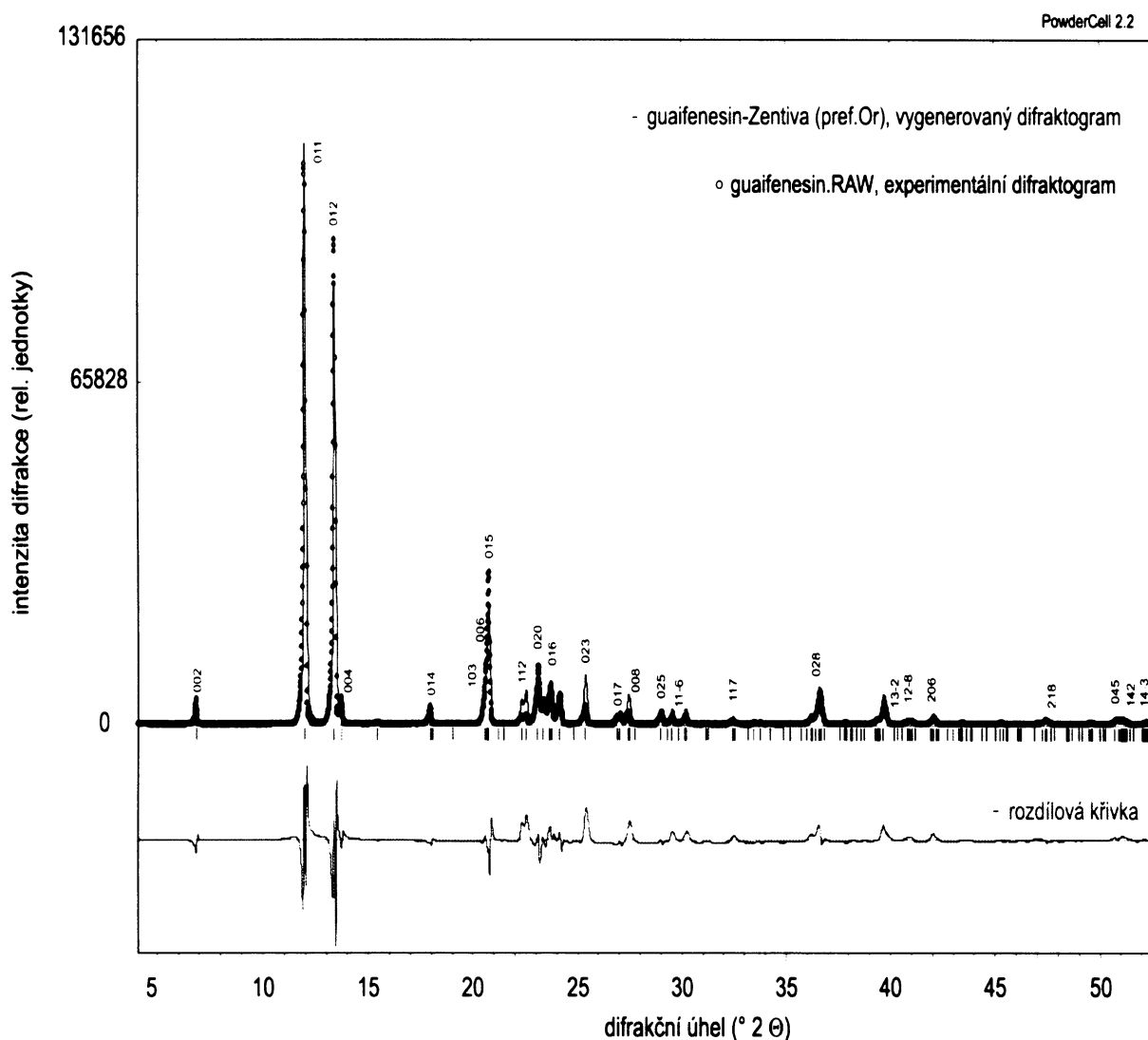
Grafický výsledek zpracování difraktogramu programem PowderCell je ukázán na obrázku 13 a 14. Aby bylo možno difraktogram zpracovat, bylo třeba vzít v úvahu přednostní orientaci, tj. změnu poměru intenzit difrakčních linií některých krystalografických rovin, které jsou relativně více zastoupeny díky anizotropii krystalů a díky jejich přednostnímu vystavení primárnímu RTG svazku při přípravě vzorku pro RTG difrakci.



**Obrázek 14:** Ukázka zpracování difraktogramu v programu PowderCell po konečném vypřesnění obsahu a parametrů krystalové buňky všech aktivních složek.

**Tabulka 18:** Strukturní informace o paracetamolu získané z cambridgeské strukturní databáze a potřebné jako vstupní data ke zpracování difraktogramu analgetika programem PowderCell.

Cambridge Crystallographic Data Centre CCDC						
Database code CSD HXACAN01						
Chemical formula summary 'C8H9NO2'						
Acta Crystallogr., Sect. B: Struct. Crystallogr. Cryst. Chem. vol. 32, year 1976, first page 1283						
M. Haisa, S. Kashino, R. Kawai, H. Maeda						
Chemical name systematic: N-(4-Hydroxyphenyl)acetamide						
Chemical name common: Acetaminophen; p-hydroxyacetanilide; Panadol; Paracetamol						
Polymorph I						
Symmetry cell setting: monoclinic						
Symmetry space group name: P 21/a						
	a (Å)	b (Å)	c (Å)	$\alpha$ (°)	$\beta$ (°)	$\gamma$ (°)
CELL	7.1249	9.4015	12.9372	90	115.664	90
Atom	Wyckoff index	x/a	y/b	z/c		
C1	4e	0.8481	0.6453	0.9389		
C2	4e	0.7558	0.6438	0.0142		
C3	4e	0.8279	0.7344	0.1089		
C4	4e	0.9931	0.826	0.129		
C5	4e	0.0887	0.8256	0.0551		
C6	4e	0.016	0.7359	0.9613		
C7	4e	0.5997	0.4933	0.7804		
C8	4e	0.5824	0.4104	0.6767		
H1	4e	0.649	0.579	0.001		
H2	4e	0.77	0.728	0.165		
H3	4e	0.204	0.887	0.07		
H4	4e	0.079	0.736	0.909		
H5	4e	0.184	0.945	0.239		
H6	4e	0.874	0.549	0.807		
H7	4e	0.444	0.417	0.618		
H8	4e	0.702	0.407	0.672		
H9	4e	0.578	0.299	0.694		
N1	4e	0.7855	0.5564	0.8401		
O1	4e	0.056	0.9149	0.2228		
O2	4e	0.4542	0.5023	0.8077		



**Obrázek 15:** Difraktogram čistého guaifenesinu. Fit s přednostní orientací (011).

Provedl jsem proto zpracování celého difraktogramu dvou čistých složek, guaifenesinu a kofeinu, ke zjištění parametrů jejich přednostní orientace (viz tabulka 19). Ta se popisuje parametrem  $o$ , který nabývá velikosti klesající od 1 k 0,5 pro destičky s rostoucím poměrem plochy k tloušťce a rostoucí hodnoty od 1 k 10 pro jehlice s rostoucím poměrem délky k průřezu.

**Tabulka 19:** Příklady výstupu programu PowderCell při zpracování difraktogramu čistých složek guaifenesinu a kofeinu s cílem zjistit přednostní orientaci těchto složek.

Kofein			Guaifenesin		
R-values Rp=16.53      Rwp=24.31      Rexp=27.57 1 iterations of 5			R-values Rp=41.69      Rwp=60.31      Rexp=30.72 2 iterations of 5		
parameter	old	new	parameter	old	new
<u>kofein-Zentiva</u>			<u>guaifenesin-Zentiva</u>		
scaling :	6.2240	6.4231	scaling :	8.0946	8.5790
lattice a :	43.1838	43.1469	lattice a :	4.9858	4.9845
b :	15.1063	15.0884	b :	7.6829	7.6830
c :	6.9556	6.9525	c :	25.6783	25.6744
beta :	99.0749	99.1033			
profile U :	0.5000	0.5000	profile U :	0.0100	0.5000
PsVoigt1 V :	0.0500	0.0486	PsVoigt1 V :	0.0100	0.0000
W :	0.0060	0.0050	W :	0.0127	0.0071
mixing na :	0.5090	0.5116	mixing na :	0.6201	0.6030
nb :	0.0000	-	nb :	0.0000	-
overall B :	0.0000	-	overall B :	0.0000	-
pref. orient. o1 :	1.2970	1.2743	pref. orient. o1 :	0.5001	0.5162
March-Dollase (0 0 1)			March-Dollase (0 1 1)		
<u>global parameters</u>			<u>global parameters</u>		
zero shift :	0.0020	0.0073	zero shift :	0.0000	-
displacement :	-0.0050	-0.0154	displacement :	0.0000	-
backgr. polynom :	2	2	backgr. polynom :	5	5
coeff. a0 :	0.0000	17.4814	coeff. a0 :	-107.7916	-133.8591
a1 :	0	-0.04824	a1 :	35.02	42.46
a2 :	0	-0.003067	a2 :	-3.134	-3.843
			a3 :	0.1122	0.1392
			a4 :	-0.001766	-0.002214
			a5 :	1.024E-5	1.294E-5

**Tabulka 20:** Srovnání šarží surovin pro analgetikum podle výsledku RTG práškové difrakce. Čísla 1 a 2 značí šarží vstupní suroviny dodané výrobcem analgetika.

	<b>Mřížkové parametry</b>	<b>Přednostní orientace</b>	<b>R<sub>WP</sub></b>
Guaifenesin 1	a=4,984 Å; b=7,683 Å; c=25,67 Å	(011), o=0,52	24,31
Guaifenesin 2	a=4,991 Å; b=7,669 Å; c=25,72 Å	(011), o=0,52	70,96
Kofein 1	a=43,15 Å; b=15,09 Å; c=6,952 Å; β=99,10°	(001), o=1,27	24,31
Kofein 2	a=43,14 Å; b=15,09 Å; c=6,959 Å; β=99,13°	(001), o=1,19	21,74
Paracetamol 2	a=7,093 Å; b=9,360 Å; c=12,86 Å; β=115,4°	(101), o=1,56	53,78

**Tabulka 21:** Výsledky vypřesňování přednostní orientace paracetamolu v tabletovině šarže 63. Kvalita fitu se hodnotí statistickým parametrem R<sub>WP</sub> (nižší hodnota znamená lepší shodu vygenerovaného a experimentálního difraktogramu). Čísla v závorkách u všech aktivních látek označují přednostně orientované roviny. Na posledním řádku je deklarované složení analgetika.

Guaifenesin	<b>Přednostní orientace</b>		<b>Odhad složení (%)</b>			R <sub>WP</sub>
	Kofein	Paracetamol	Guaifenesin	Kofein	Paracetamol	
(011)	(001)	ne	26,2	14,6	59,3	14,36
(012)	(001)	ne	24,5	15,1	60,3	14,41
(011)	(001)	(101)	27,2	13,6	59,2	12,97
(011)	(001)	(101)	27,0	14,9	58,1	12,76
(012)	(001)	(101)	25,4	15,5	59,1	12,71
<b>(011)</b>	<b>(001)</b>	<b>(102)</b>	<b>27,0</b>	<b>14,8</b>	<b>58,2</b>	<b>12,63</b>
<b>Relativní obsah aktivních složek podle dekl.složení</b>			<b>24,8</b>	<b>13,3</b>	<b>61,9</b>	

K ověření přednostní orientace paracetamolu bylo využito zpracování průměrného difraktogramu tabletovin šarže 63 (celkem 6 práškových směsí, každá měřena dvakrát, tabulka 21), protože kvalita fitu čistého paracetamolu (tabulka 20) nebyla uspokojivá. Při tomto testu se nevypřesňovaly ani profilové funkce, ani mřížkové parametry, ale jen přednostní orientace jednotlivých fází a jejich škálové faktory (koncentrace ve směsi).



Je jasné, že paracetamol přednostní orientaci má, statistický parametr fitu  $R_{WP}$  dosahoval minima při zvolené orientaci (101) a (102) vždy s tvarovým faktorem  $\sigma > 1$ . Fity byly stabilní (robustní), čili vypřesňované tvarové faktory  $\sigma$  se pohybovaly při opakovaném vypřesnění po vynulování předchozích hodnot a při fitování jednotlivých vzorků tabletovin a rozetřených tablet v poměrně úzkém rozmezí. Problematickým se zdál tvarový faktor kofeinu, který má podle optické mikroskopie výrazně anizometrické, jehlicovité krystaly (viz část 3.5). Zdálo se, že rozetřením se příslušný tvarový faktor zmenšuje, tj. přibližuje se “neutrální” hodnotě 1 (tj. bez přednostní orientace).

Nepříjemnou stránkou přednostní orientace částic je, že v reálném difraktogramu s podstatným překryvem difrakčních linií složek závisí škálové faktory složek, tj. odhad jejich obsahů ve směsi, poměrně značně na konkrétní hodnotě tvarového faktoru, takže správnost kvantitativní analýzy je daná správností vypřesnění tvarového faktoru a navíc i fyzikální správností příslušného algoritmu v použitém programu. Díky velkému počtu vypřesňovaných parametrů při zpracování celého difraktogramu je statistický parametr  $R_{WP}$  často příznivý (nízký) i v případě, že tvarový faktor nevypřesňujeme ale nastavujeme jeho hodnotu ručně, protože program využije k nafitování difraktogramu vypřesnění škálových faktorů všech složek a tvarových faktorů ostatních složek.

Přednostní orientace a tvarové parametry získané s čistými složkami a tabletovinami z šarže 63 byly použity jako vstupní parametry pro zpracování difraktogramu neupravených tablet (tabulka 22). Tabletovina je technologická (výrobní) směs surovin před vlastním tabletováním, tj. její složení je stejné jako složení tablet, ale neuplatňují se v ní vlivy přednostní orientace a textury. Byly vypřesňovány všechny tvarové parametry a všechny mřížkové konstanty aktivních složek. Výsledek shrnuje tabulka 22.

**Tabulka 22:** Vypřesňování přednostní orientace průměrných difraktogramů tablet jednotlivých studovaných šarží analgetika (šarže 39 a 40 vždy z difraktogramů 3 tablet, šarže 61 ze 6ti tablet a šarže 68 z 11ti tablet). Parametry fitu s nejnižším statistickým parametrem  $R_{WP}$  pro danou šarží jsou vyznačeny tučně, na posledním řádku je pro srovnání deklarované složení analgetika.

	Faktor přednostní orientace o (hkl)			Odhad obsahu (%)			$R_{WP}$
	Guaifenesin	Kofein	Paracetamol	Guaifenesin	Kofein	Paracetamol	
39	0,62 (011)	1,51 (001)	1,16 (101)	30,1	17,2	52,7	15,29
	0,58 (012)	1,44 (002)	1,16 (101)	24,6	20,2	55,2	13,88
	<b>0,58 (012)</b>	<b>1,51 (001)</b>	<b>1,16 (101)</b>	<b>24,7</b>	<b>20,3</b>	<b>55,0</b>	<b>13,40</b>
40	0,59 (011)	1,51 (001)	1,16 (101)	32,6	15,0	52,4	17,02
	<b>0,57 (012)</b>	<b>1,50 (001)</b>	<b>1,16 (101)</b>	<b>26,4</b>	<b>19,1</b>	<b>54,5</b>	<b>14,53</b>
61	0,62 (011)	1,48 (001)	1,13 (101)	34,6	15,9	49,5	15,63
	<b>0,57 (012)</b>	<b>1,49 (001)</b>	<b>1,14 (101)</b>	<b>28,4</b>	<b>19,3</b>	<b>52,3</b>	<b>12,65</b>
	0,57 (012)	1,51 (001)	1,15 (111)	28,4	19,4	52,3	13,01
	0,57 (012)	1,49 (001)	1,15 (212)	28,3	19,5	52,2	12,66
68	0,62 (011)	1,54 (001)	1,15 (101)	35,0	12,1	52,9	16,60
	<b>0,58 (012)</b>	<b>1,55 (001)</b>	<b>1,15 (101)</b>	<b>29,0</b>	<b>15,6</b>	<b>55,4</b>	<b>13,13</b>
<b>Relativní obsah aktivních složek podle dekl.složení</b>				<b>24,8</b>	<b>13,3</b>	<b>61,9</b>	

Kvantitativní XRD analýza tablet analgetika je zjevně ovlivněna texturou danou lisováním tablety, protože všechny analýzy nerozetřených tablet dávají zvýšené koncentrace guaifenesinu a kofeinu a snížené koncentrace paracetamolu (viz tabulka

22). Že jde o vliv lisování je patrné z odhadu složení tabletoviny šarže 63 (viz tabulka 21), které jsou podstatně blíže deklarovanému složení než tablety šarží 39, 40, 61 a 68.

Ukázalo se, že texturní vliv se podstatně zmenší po rozetření tablet. Analýza prášku z rozetřených tablet analgetika šarže 39 dává složení, které se prakticky shoduje s deklarovaným složením (viz tabulka 23). Nepřímým důkazem, že lisováním tablety dochází k deformaci difraktogramu, které ztěžuje jeho zpracování ke kvantitativní analýze, je horší statistický ukazatel fitu (vyšší  $R_{WP}$ ) ve srovnání s práškem. Jak ukazuje srovnání analýzy lékových forem šarže 39 po přímém měření tablet a po měření z nich získaného prášku, je textura vzniklá lisováním možná daná deformací krystalů tlakem, která relaxuje po jejich mechanickém rozrušení. Jiné vysvětlení je krystalografické “poškození” krystalů ve velmi tenké povrchové vrstvě léčiva [44].

Při srovnání vypřesněných tvarových parametrů přednostní orientace krystalů čistých látek guaifenesinu a kofeinu před zpracováním, po smíchání tabletoviny, po vylisování tablet složek tablet, a konečně po jejich rozetření je patrné, že při manipulaci dochází k zvýraznění přednostní orientace po lisování a naopak k jejímu potlačení po rozetření tablet.

**Tabulka 23:** Potlačení textury lékových forem šarže 39 rozetřením tablet a měřením prášku v konvenční RTG kyvetě. Difraktogramy byly získány jako průměr difraktogramů tří tablet nebo tří prášků z týchž tablet.

	Faktor přednostní orientace o (hkl)			Odhad obsahu (%)			$R_{WP}$
	Guaifenesin	Kofein	Paracetamol	Guaifenesin	Kofein	Paracetamol	
tablety	0,66 (011)	1,58 (001)	1,14 (101)	29,4	17,3	53,2	16,06
	0,58 (012)	1,57 (001)	1,14 (101)	23,9	20,3	55,7	14,02
prášek	0,84 (011)	1,19 (001)	1,06 (101)	24,8	13,4	61,8	13,48
	0,78 (012)	1,19 (001)	1,07 (101)	23,6	13,9	62,5	13,07
<b>Relativní obsah aktivních složek podle dekl.složení</b>				<b>24,8</b>	<b>13,3</b>	<b>61,9</b>	

Jak tedy plyne z tabulky 23, jedním ze způsobů potlačení přednostní orientace a hlavně textury, vzniklé v tabletě lisováním, je její rozetření na prášek. Použil jsem proto tento postup i při RTG práškové difrakci ostatních šarží analgetika. Srovnání výsledků analýzy takto získaných prášků je v tabulce 24 pro šarže 39, 40, 66 – 69 a tři podšarže šarže 61. Výsledky jsou ve velmi dobrém souhlase s deklarovaným složením léčiva. Podobně jako v předchozích případech je nemožné jen na základě statistického hodnocení fitu rozhodnout o správnosti volby směru (011) nebo (012) přednostní orientace guaifenesinu, ale je velmi dobře patrné, že podle této volby je systematicky posunuta nalezená koncentrace guaifenesinu i kofeinu. Důvodem ovlivnění výsledku odhadu obsahu obou složek při změně parametrů jedné z nich je překryv důležitých difrakčních linií obou složek v oblasti mezivinných vzdáleností  $d$  7,6 až 7,25 Å (13,4 až 14,1°  $2\theta$  s Co rentgenkou), konkrétně difrakce (011) guaifenesinu ovlivněné přednostní orientací a dvou nejintenzivnějších linií kofeinu. Výsledky získané za předpokladu přednostní orientace guaifenesinu v rovině (012) jsou ale systematicky správnější vzhledem k nominální hodnotě složení.

**Tabulka 24:** Výsledky analýzy RTG difrakcí prášků získaných rozetřením vždy deseti tablet z každé šarže nebo podšarže. Kofein má vždy přednostní orientaci (001) a paracetamol má vždy přednostní orientaci (101). Přednostní orientace guaifenesinu v příslušném fitu je uvedena v závorce ve druhém sloupci.

Šarže Podšarže	Faktor přednostní orientace o (hkl)			Odhad obsahu (%)			R <sub>WP</sub>
	Guaifenesin	Kofein	Paracetamol	Guaifenesin	Kofein	Paracetamol	
<b>39</b>	0,80 (011)	1,16	1,06	24,6	11,9	62,4	<b>12,68</b>
	0,76 (012)	1,16	1,08	23,8	13,5	62,7	13,45
<b>40</b>	0,75 (011)	1,20	1,06	23,7	13,4	62,3	13,39
	0,71 (012)	1,22	1,06	21,6	14,2	64,2	<b>13,21</b>
<b>61</b>	0,79 (011)	1,18	1,09	24,5	13,0	62,5	<b>12,02</b>
1	0,73 (012)	1,19	1,09	22,9	13,7	63,4	12,08
<b>61</b>	0,77 (011)	1,19	1,07	25,1	12,2	62,7	<b>11,33</b>
8	0,73 (012)	1,21	1,08	23,3	13,0	63,7	11,45
<b>61</b>	0,77 (011)	1,17	1,08	25,0	13,3	61,7	13,56
18	0,74 (012)	1,19	1,09	23,6	14,1	62,2	<b>13,30</b>
<b>66</b>	0,77 (011)	1,20	1,22	26,7	13,1	60,2	12,91
	0,73 (012)	1,22	1,22	25,0	14,0	61,0	<b>11,94</b>
<b>67</b>	0,74 (011)	1,18	1,10	25,0	13,3	61,7	13,09
	0,71 (012)	1,20	1,11	23,5	14,3	62,2	<b>12,74</b>
<b>68</b>	0,73 (011)	1,20	1,10	24,6	12,7	62,7	12,63
	0,69 (012)	1,23	1,10	22,6	13,8	63,7	12,60
<b>69</b>	0,72 (011)	1,26	1,06	24,9	11,6	63,4	11,68
	0,68 (012)	1,29	1,07	22,6	12,7	64,8	<b>11,18</b>
průměr pro G (011)				24,9	12,7	62,2	
průměr pro G (012)				23,2	13,7	63,1	
průměrná systematická chyba (%) pro G (011)				0,4	-4,3	0,4	
průměrná systematická chyba (%) pro G (012)				-6,4	3,0	1,9	
R.S.D. (%) pro G (011)				3,0	4,9	1,4	
R.S.D. (%) pro G (012)				3,9	3,8	1,8	
<b>Relativní obsah aktivních složek podle dekl.složení</b>				<b>24,8</b>	<b>13,3</b>	<b>61,9</b>	

Pozn.: Průměrná systematická chyba je vyjádřena jako průměrný rozdíl mezi nalezeným a deklarovaným složením a R.S.D. (%) je relativní směrodatná odchylka.

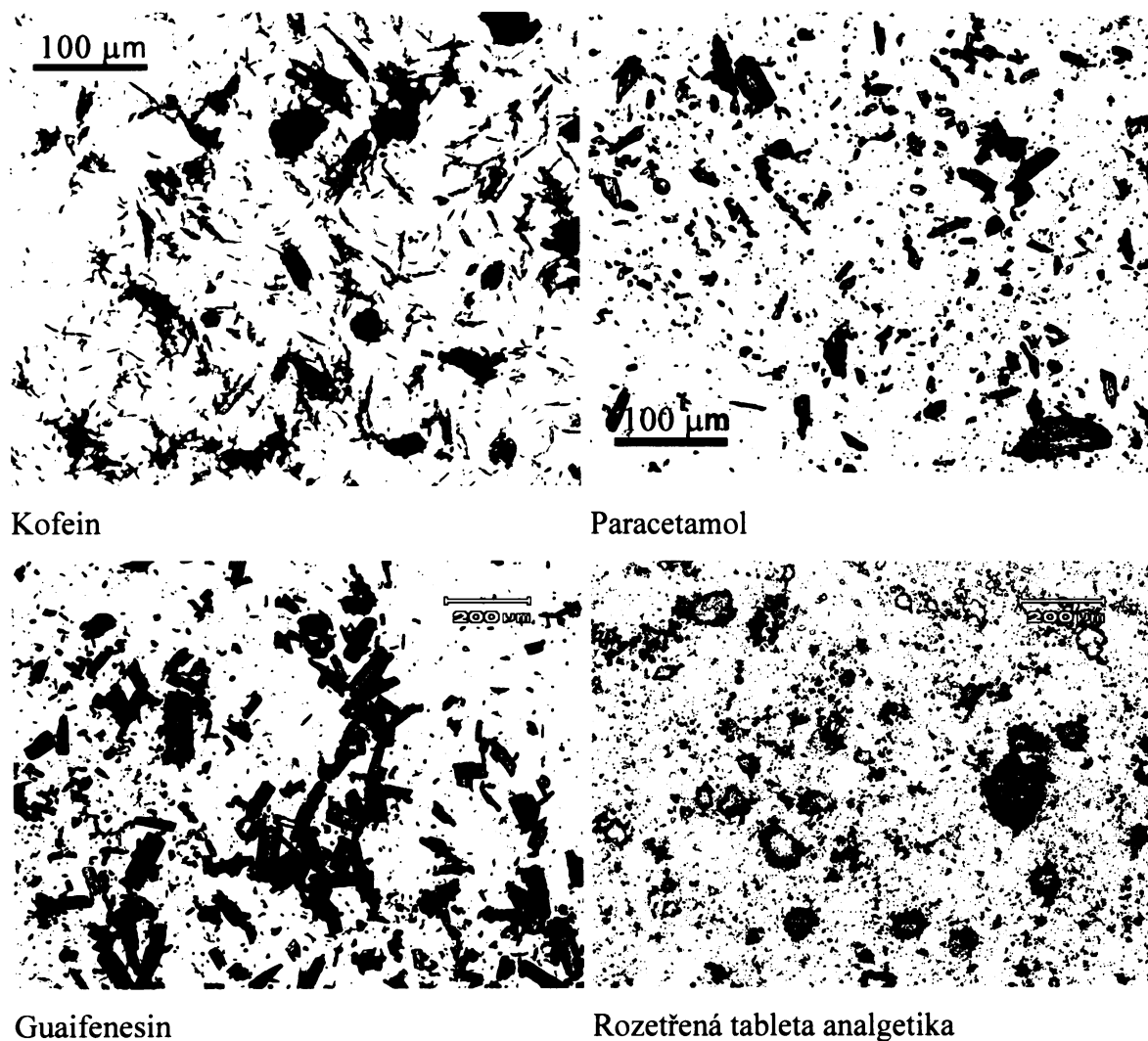
**Tabulka 25:** Příklad měření celé a obroušené (do hloubky asi 0,5 mm) tablety šarže 61 podšarže 1. Kofein má vždy přednostní orientace (001) a paracetamol má vždy přednostní orientaci (101).

Tableta	Faktor přednostní orientace o (hkl)			Odhad obsahu (%)			R <sub>WP</sub>
	Guaifenesin	Kofein	Paracetamol	Guaifenesin	Kofein	Paracetamol	
celá	0,62 (011)	1,48	1,13	34,6	15,9	49,5	15,63
	0,57 (012)	1,49	1,14	28,4	19,3	52,3	12,65
obroušená	0,80 (011)	1,09	1,06	24,7	11,2	64,2	11,61
	0,75 (012)	1,11	1,07	24,1	11,6	64,3	11,17
<b>Relativní obsah aktivních složek podle dekl.složení</b>				<b>24,8</b>	<b>13,3</b>	<b>61,9</b>	

Pokusil jsem se zjistit, zda texturní vliv opravdu poškozuje jen povrchovou vrstvu lékové formy. Jak lze vidět v tabulce 25, měření tablet po ubroušení pár desetin milimetrů vrstvy vede k téměř deklarovaným hodnotám obsahů všech aktivních složek. Bohužel v této práci již nezbyl čas změřit více vzorků. Směr, kterým by se ale kvantitativní analýza pevné lékové formy pomocí XRD měla ubírat, byl zajisté názorně ukázán a bude předmětem další práce.

### 3.5 Optická mikroskopie

Cílem optické mikroskopie bylo zjistit velikost částic vzhledem k malé navážce na IR spektroskopii, tvar částic vzhledem k přednostní orientaci při XRD a odhadnout, zda po roztření tablet analgetika jsou ještě patrné původní krystaly složek, což by mohlo vést k nepřesnosti IR spektroskopie a částečně i XRD.



**Obrázek 16:** Fotografie kofeinu, paracetamolu, guaifenesinu a rozetřené tablety analgetika.

Tabulka 26: Přibližné tvary a velikost částic podle optické mikroskopie.

Složení krystalů	Tvar	Velikost
Paracetamol	podlouhlé krystaly (kvádry)	20 x 50 x 20 $\mu\text{m}$
Guaifenesin	hranoly	do 150 $\mu\text{m}$
Kofein	jehlice	do 30 $\mu\text{m}$
	agregáty	do 50 $\mu\text{m}$
Rozetřená tableta analgetika na IR		částice menší než 15 $\mu\text{m}$
		shluky částic do 100 $\mu\text{m}$

Pomocí optické mikroskopie jsem zjistil, že po rozetření tablet analgetika jsou částice velmi malé (viz obrázek 16 vpravo dole), takže se domnívám, že jsem tablety téměř dokonale rozetřel a ani při navážce 1 mg na měření IR spektroskopii není velké riziko ovlivnění výsledku příliš velkými částicemi jednotlivých složek. Optickým mikroskopem jsem zjistil, že používaný kofein má opravdu jehlicovitý tvar krystalů, všechny jeho částice jsou anizometrické, což může pomoci vysvětlit přednostní orientaci, která se uplatňuje při RTG difrakční analýze. U ostatních složek není snadné odhadnout tvar, ale ani paracetamol ani guaifenesin nemají izometrické krystaly.



### 3.6 Srovnání metod

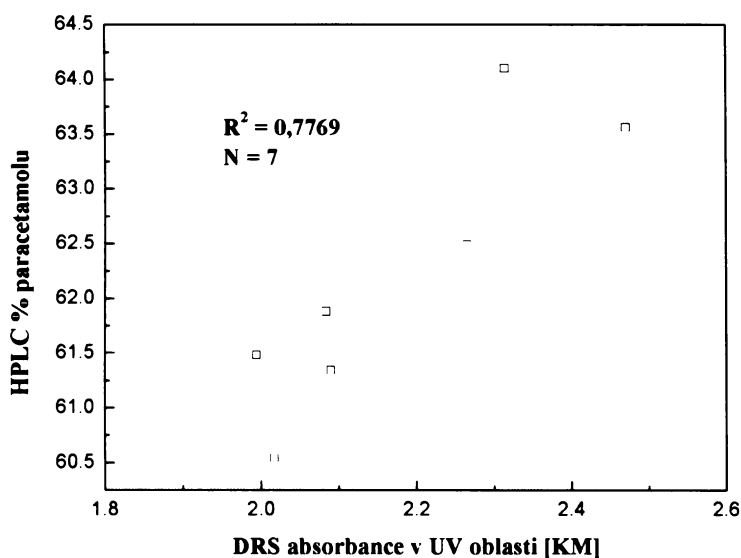
#### 3.6.1 Porovnání výsledků použitých metod mezi tabletami šarže 61

Ve výsledkové části 3.1 byl ukázán překryv absorpčních pásů složek v difúzně reflexních UV spektrech. Z toho vyplývá, že je z difúzně reflexních UV spekter vytěžitelná pouze jedna hodnota, tj. celková absorbance a tím je dána nemožnost interpretace ve smyslu procentuálního složení. Lze ale čekat, že je vztah mezi DRS absorbancí a procentuálním obsahem paracetamolu. Proto jsem porovnával výsledky DRS s výsledky stanovení obsahu paracetamolu HPLC dodané firmou Zentiva, a.s. a též výsledky DRS s odhadem procentuálního zastoupení paracetamolu z ostatních metod použitých v této práci (viz obrázky 20 a 21 a tabulka 27). Srovnání DRS absorbance s výsledky procentuálního obsahu paracetamolu stanoveného pomocí HPLC je v obrázku 20 a srovnání DRS absorbance s výsledky procentuálního obsahu paracetamolu stanoveného pomocí IR spektroskopie s multilineární regresí (MLR) je v obrázku 21. Při obou srovnáních byl použit soubor sedmi tablet. Korelace jsou statisticky významné na hladině  $\alpha = 0,05$ . Korelační koeficient  $R^2$  pro vztah mezi výsledky DRS a stanovením obsahu paracetamolu IR spektroskopii s MLR je 0,5357 a korelační koeficient  $R^2$  pro vztah mezi výsledky DRS a stanovením obsahu paracetamolu HPLC je 0,7769. V obrázku 22 je uvedena korelace výsledků IR a HPLC při analýze paracetamolu. Korelační koeficient  $R^2$  je statisticky významný na hladině  $\alpha = 0,05$ , jeho hodnota je 0,4347, což je nižší než hodnota korelačních koeficientů pro vztah IR(obsah paracetamolu)–DRS a HPLC(obsah paracetamolu)–DRS, patrně je výsledek ovlivněn nižší přesností IR. Srovnání bylo provedeno opět se souborem sedmi tablet.

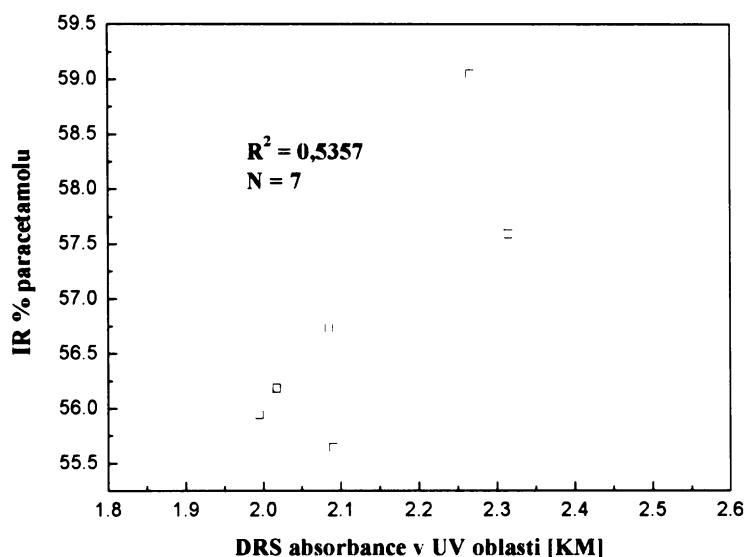
V obrázcích 23 a 24 je uveden vztah mezi výsledky získaných IR spektroskopii s MLR a UV spektroskopii roztoků tablet analgetika při analýze guaifenesinu a paracetamolu. V tomto souboru je vždy čtrnáct tablet. Podobně jako při korelaci výsledků stanovení obsahu paracetamolu IR spektroskopie s MLR a HPLC je nápadná

nejednotková směrnice těchto závislostí (viz tabulka 27). Svědčí to o koncentrační nelinearitě IR spektroskopie s MLR a je to v souladu i s nejednotkovou směrnici kalibračních křivek IR spektroskopie (viz obrázek 11 a 12 na str. 43 a 44).

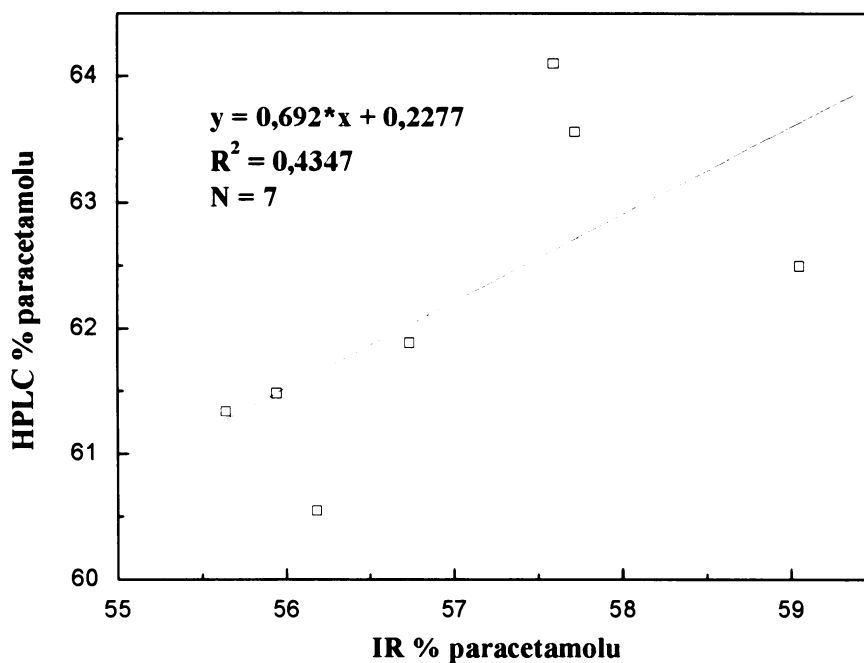
Přesto je ze srovnání výsledků získaných pro různé tablety v rámci jedné šarže zřejmé, že jak DRS tak IR spektroskopii v kombinaci s multilineární regresí by bylo možné použít k vyhledávání tablet analgetika s extrémním složením, tj. podezřelé z obsahové nestejnomy.



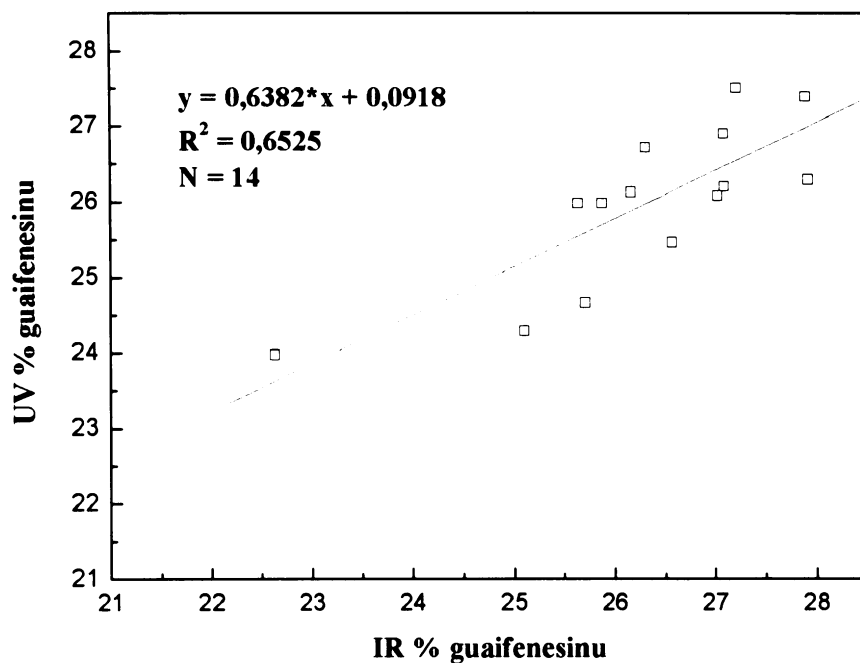
Obrázek 20: Vztah mezi výsledky DRS a HPLC (obsah paracetamolu).



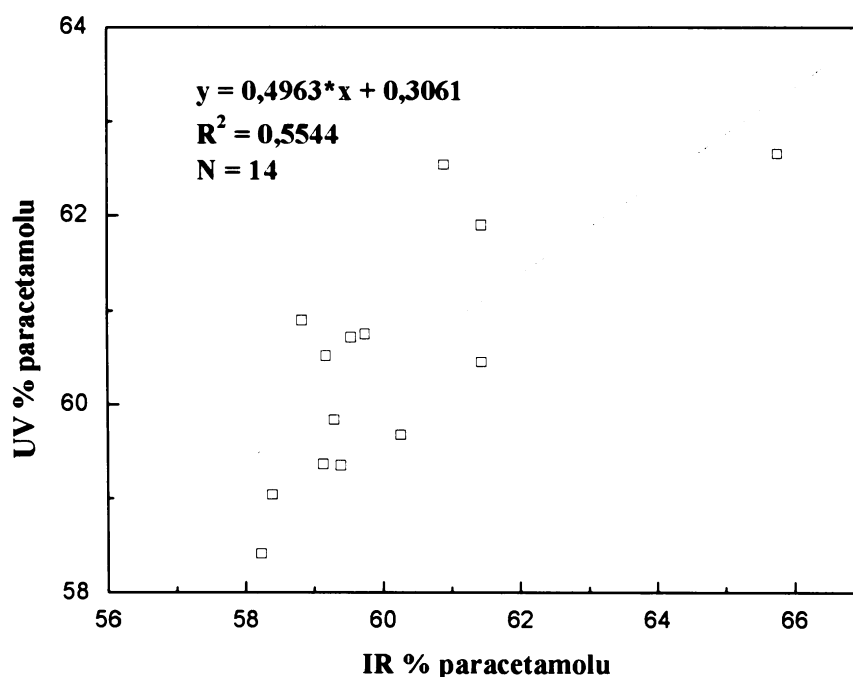
Obrázek 21: Vztah mezi výsledky DRS a IR spektroskopie (obsah paracetamolu).



Obrázek 22: Vztah mezi výsledky obsahu paracetamolu získané IR spektroskopií a HPLC.



Obrázek 23: Vztah mezi výsledky obsahu guaifenesinu získané IR spektroskopií a UV spektroskopií roztoků.



**Obrázek 24:** Vztah mezi výsledky obsahu paracetamolu získané IR spektroskopií a UV spektroskopií roztoků.

**Tabulka 27:** Korelace tablet šarže 61 analgetika s extrémními hodnotami DRS statisticky významné na hladině  $\alpha = 0,05$ .

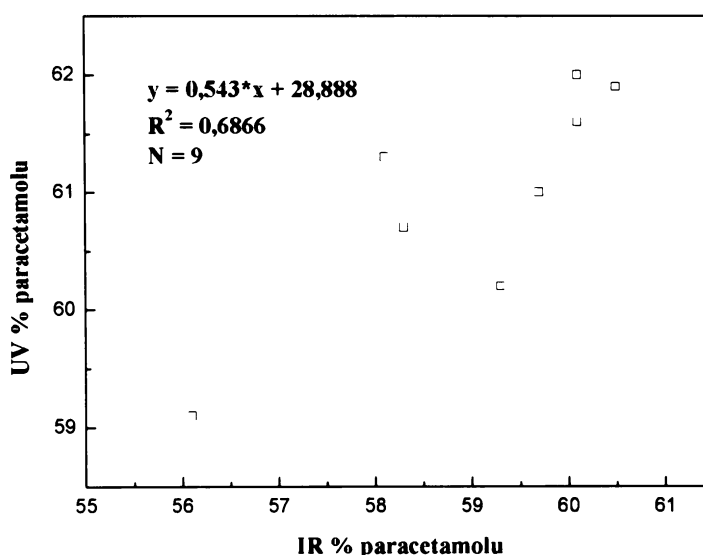
Korelace	R	R <sup>2</sup>	a	n
[KM] DRS-% paracetamolu IR	0,7320	0,5357		7
[KM] DRS-% paracetamolu HPLC	0,8814	0,7769		7
% paracetamolu IR-HPLC	0,6593	0,4347	0,692	7
% guaifenesinu UV roztoků-IR	0,8078	0,6525	0,6382	14
% paracetamolu IR-UV roztoků	0,7446	0,5544	0,4963	14

Pozn.: a je směrnice korelační přímky, n je počet analyzovaných tablet.

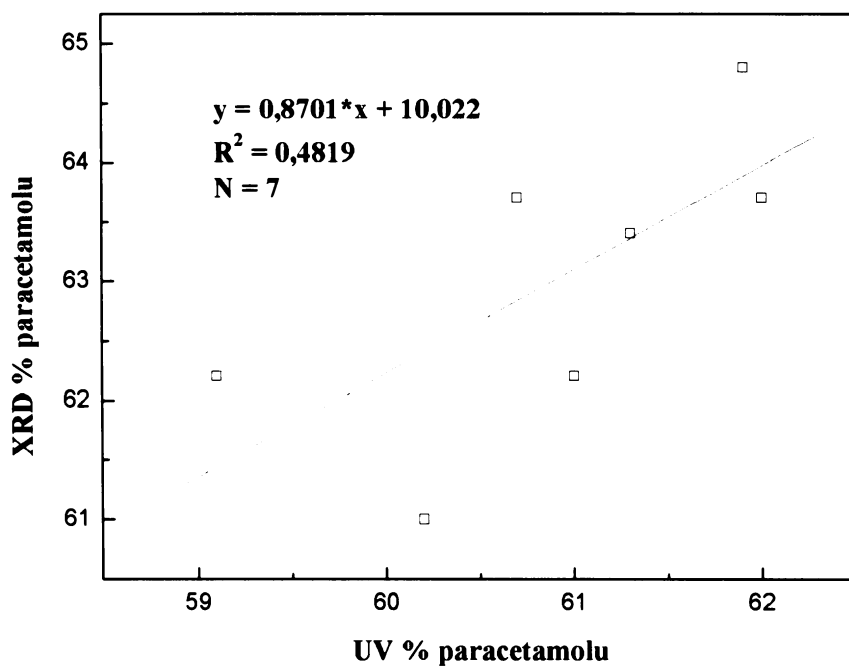
### 3.6.2 Porovnání výsledků použitých metod mezi šaržemi analgetika

Srovnání mezi šaržemi je zcela jiné než srovnání mezi tabletami v rámci šarže. U analýz průměrů šarží analgetika je vždy mnoho zprůměrovaných výsledků jednotlivých tablet nebo mnoho zprůměrovaných měření, takže se míň uplatňuje obsahová stejnoměrnost. Srovnání mezi šaržemi je test přísný pro XRD, protože u XRD je značný vliv textury a krystalinity (tvaru a velikosti částic) složek, kvality smíchání složek při výrobě a aktuálního seřízení tabletovacího lisu. Bohužel k ověření XRD jsem neměl od výrobce analgetika k dispozici průměrné analýzy složení celých šarží, takže jsem výsledky XRD srovnával s výsledky UV spektroskopie roztoků (obrázek 26 a 28) a s IR spektroskopii v kombinaci s multilineární regresí (MLR) (obrázek 27). Srovnání mezi výsledky analýz UV spektroskopii roztoků rozpuštěného analgetika a analýz IR spektroskopii s MLR je na obrázku 25 a 29.

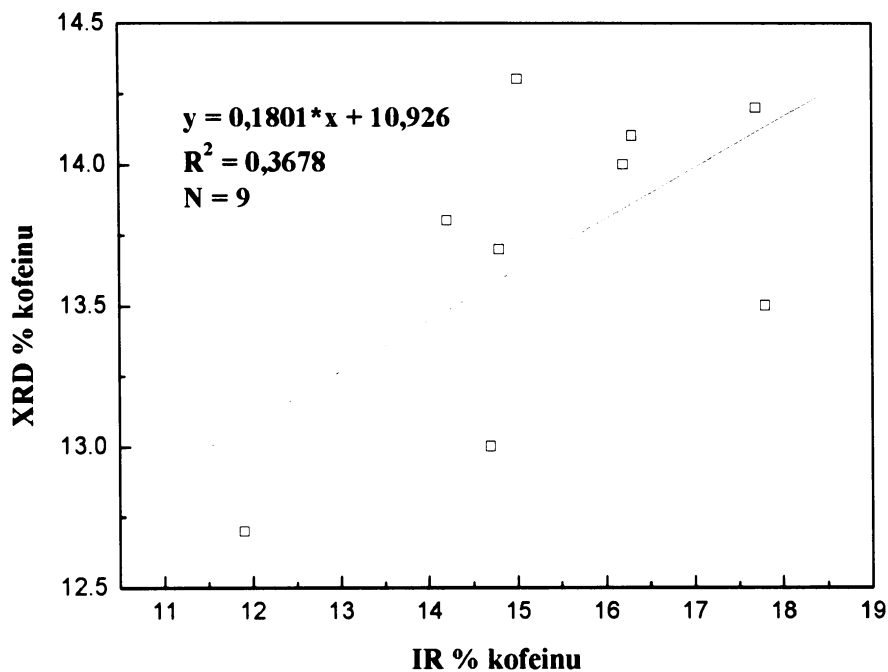
Jedním z důvodů nízkých korelačních koeficientů  $R^2$  při porovnávání výsledků použitých metod mezi šaržemi analgetika (viz tabulka 28 a 29) může být vliv nedokonalé obsahové stejnoměrnosti. Je obtížné porovnávat metody, pokud při měření nejsou použity identické a dokonale homogenní směsi z dostatečného počtu zhomogenizovaných tablet analgetika.



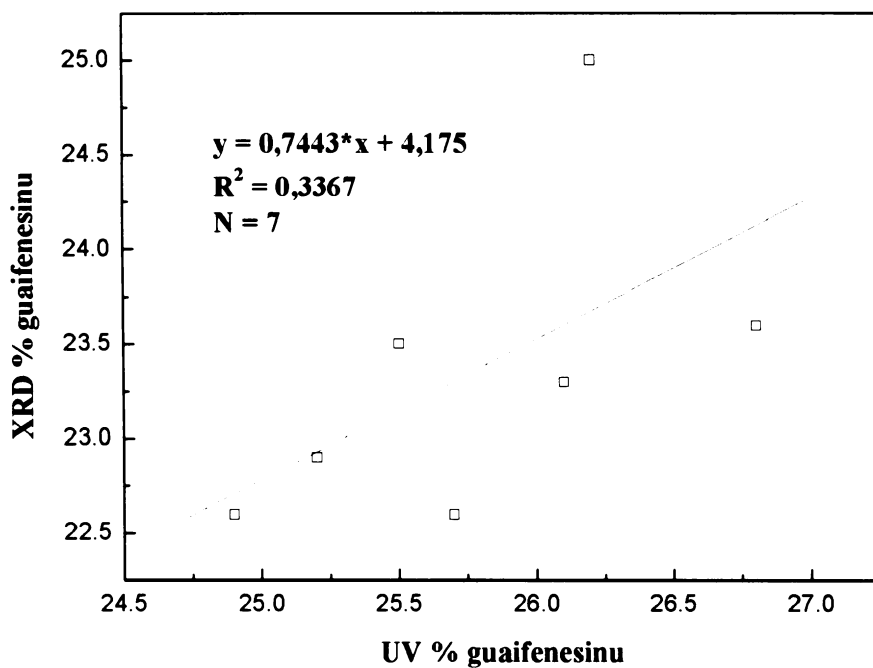
Obrázek 25: Vztah mezi výsledky obsahu paracetamolu IR a UV roztoků.



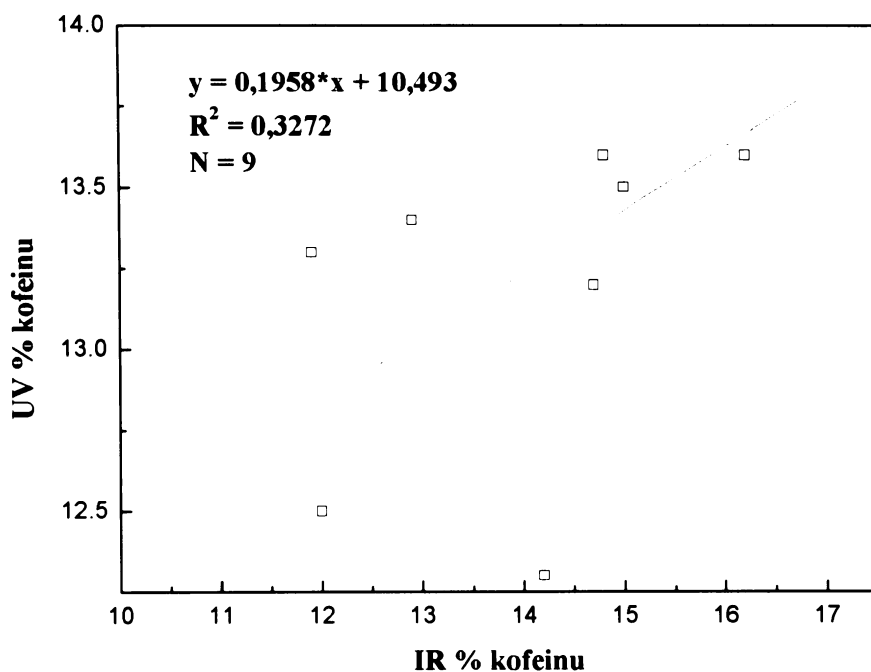
Obrázek 26: Vztah mezi výsledky obsahu paracetamolu získanými UV spektroskopií roztoků a XRD.



Obrázek 27: Vztah mezi výsledky obsahu kofeinu získanými IR spektroskopií a XRD.



Obrázek 28: Vztah mezi výsledky obsahu guaifenesinu získanými UV spektroskopií roztoků a XRD.



Obrázek 29: Vztah mezi výsledky obsahu kofeinu získanými IR spektroskopií a UV spektroskopií roztoků.

Bohužel výsledky DRS v UV oblasti nekorelují s žádnými výsledky z ostatních použitých metod (IR spektroskopie s MLR, UV spektroskopie roztoků rozpuštěného analgetika, XRD). Je to zřejmě dáno velkou citlivostí k textuře a z toho vyplývající velké chyby měření (tzn. suma chyb, které způsobí, že se potlačí vliv složení).

**Tabulka 28:** Korelace šarží analgetika statisticky významné na hladině  $\alpha = 0,05$ .

<b>Korelace</b>	<b>R</b>	<b>R<sup>2</sup></b>	<b>a</b>	<b>n</b>
% paracetamolu IR–UV roztoků	0,8286	0,6866	0,54	9
% kofeinu IR–XRD	0,6065	0,3678	0,18	9
% paracetamolu UV roztoků–XRD	0,6942	0,4819	0,87	7

Pozn.: a je směrnice korelační přímky, n je počet analyzovaných šarží.

**Tabulka 29:** Korelace šarží analgetika statisticky významné na hladině  $\alpha = 0,10$ .

<b>Korelace</b>	<b>R</b>	<b>R<sup>2</sup></b>	<b>a</b>	<b>n</b>
% guaifenesinu UV roztoků–XRD	0,5803	0,3367	0,74	7
% kofeinu IR–UV roztoků	0,5720	0,3272	0,20	9

Pozn.: a je směrnice korelační přímky, n je počet analyzovaných šarží.



## 4. Diskuse

### 4.1 Porovnání všech metod

Jak bylo řečeno v úvodu (část 1.1), metody analýzy léčiv lze porovnávat z více hledisek, především z hlediska časové náročnosti, přesnosti a správnosti. Základní rysy metod, které jsem použil při analýze analgetika, jsou shrnuty v tabulce 30. V tabulce nejsou uvedeny přesnosti metod, ty jsou srovnatelné nebo lepší než správnosti, vyjádřené jako systematická chyba. Předpokládal jsem, že skutečné složení léčiva je v dlouhodobém měřítku stejné jako deklarované složení.

Tabulka 30: Srovnání metod použitých při analýze pevné lékové formy. Pro srovnání je uvedena validovaná metoda (HPLC) výrobce analgetika.

Metoda	Doba pro přípravu vzorku	Trvání měření	Nutnost kalibrace	Možné použití
DRS	–	minuty	NE	homogenita složení v rámci šarže
IR	do deseti minut	minuty	ANO	složení aktivních složek, systematická chyba < 10 rel. %
XRD tablety	–	desítky minut	NE	složení aktivních složek, systematická chyba ~ 10 rel. %
XRD prášku	minuty	desítky minut	NE	složení aktivních složek, systematická chyba < 5 rel. %
UV roztoku	desítky minut	minuty	ANO	složení aktivních složek, systematická chyba < 2,5 rel. %
HPLC	desítky minut	desítky minut	ANO	chyba < 2,0 rel. %

## 4.2 Perspektivnost kvantitativní analýzy složení lékových forem

Posouzením produktivity metod (viz tabulka 30) zjistíme, že všechny vyžadují podobný celkový čas. S nároky na manuální práci se už objevují odlišnosti, konkrétně u měření IR spektroskopie v KBr tabletách je kritický moment pečlivá příprava vzorků. Nejrychlejší co do trvání samotného měření je DRS, ale výsledky v porovnání s ostatními metodami jsou nejchudší. XRD je zcela standardizovaná metoda, časově nejnáročnější je samotné měření, které je v řádu nízkých desítek minut při použití rychlých (vícekanálových) detektorů, ale při měření na strojích s bodovým detektorem (proporcionálním nebo scintilačním) by měření trvalo hodiny.

Měření pevné lékové formy DRS se nejeví jako perspektivní metoda pro kvantitativní analýzu složení lékových forem. Moc velký vliv hraje výroba tablety, tj. doba míchání, způsob tabletování a/nebo rozdíly ve vstupních ingrediencích, která odpovídá při DRS měření poměrně značná variabilita mezi šaržemi.

Podobný problém při posuzování perspektivnosti metody pro kvantitativní analýzu má i IR spektroskopie. Konkrétně se jedná o již zmiňovaný kritický moment přípravy vzorku. Zjistil jsem, že ručně není možné dosáhnout dostatečné reprodukovatelnosti. Navíc problémem u IR oproti všem použitým metodám je vysoká systematická chyba měření nebo zpracování multilineární regrese.

Velice perspektivní metodou ohledně stanovení kvantitativního složení lékových forem je UV–Vis spektroskopie roztoků. Tato metoda je velice přesná a též nedoceněná. Multilineární regrese použitá v rámci této metody umožňuje analýzu bez separace složek, i když se jejich absorpční pásy složek překrývají.

Velmi perspektivní metodou kvantitativní analýzy pevných lékových forem je XRD. Tato metoda je sice hodně ovlivňována texturou vzorku, ale tuto překážku je možno výrazně omezit, například rozetřením vzorku, kdy se dosahuje výborných výsledků, nebo obroušením povrchu vzorku o několik desetin milimetru. Obroušení povrchu je poměrně nenáročná operace. Bohužel už ji nebylo možno v rámci diplomové práce dostatečně podrobně prověřit.

### 4.3 Perspektivy XRD

Je více než jasné, že prášková XRD je jedna z nejperspektivnějších nedestruktivních metod analýzy vícesložkových pevných lékových forem, jsou-li aktivní složky v minimálním zastoupení 2 až 5 %. Jednou z největších výhod je nedestruktivnost metody. Z toho vyplývá možnost dalšího použití změřeného vzorku po XRD, například analýzy dalšími metodami (HPLC, IR atd.). Není problém analyzovat jak práškové vzorky, tak celé tablety a s dnešní možností používat automatické podavače vzorků a možností používat moderní rychlé detektory je představitelná rychlá a efektivní práce s většími soubory vzorků, dříve u XRD nepředstavitelná.

XRD je velmi efektivní metoda identifikace složek neznámých směsí. Provedli jsme test automatické kvalitativní analýzy XRD záznamu zkoumaného analgetika. V testu pomocí databáze léčiv byla složka s největším obsahem (paracetamol) identifikována jako první “kandidát”. Identifikovaná hlavní složka ukazuje i blíže neinformované obsluze, že léčivo je analgetikum či antipyretikum. Druhou a třetí složku (guaifenesin a kofein) pak lze identifikovat po ručním výběru ze seznamu “kandidátů”, mezi kterými databáze nabízí i velmi nepravděpodobné látky.

Při kvantitativní analýze pomocí Rietveldovy metody s využitím strukturních modelů všech aktivních složek jsou rozsáhlé databáze, kde se dají najít struktury analytů. Rentgenová difrakční analýza nemá velké nároky na laboratorní práci, naopak používá se nejvýš roztírání vzorků a ostatní operace při XRD jsou standardizované. Zajisté je třeba zmínit u XRD úspěšné uplatnění Rietveldovy metody, která nevyžaduje kalibraci, což snižuje pracnost metody a umožňuje pracovat i bez přístupu k čistým složkám směsí. XRD představuje též jednu z nejflexibilnějších metod, konkrétně při analýze nových vzorků (preparátů) není třeba hledat a optimalizovat separační proceduru, což je v praxi jinak běžná věc. Jisté je, že vývoj na poli krystalografie se nezastaví, takže se například databáze průběžně stále doplňují novými strukturami. Rozvoj hardwaru pro XRD asi dále povede ke zkrácení doby analýzy.

#### 4.4 Obsahová stejnoměrnost tablet analgetika

Posuzování obsahové stejnoměrnosti tablet analgetika neinvazivní metodou DRS se jeví jako vhodná metoda. Porovnává spektra (absorbance) sice bez možnosti přímého kvantitativního analytického výstupu, ale pracuje velmi rychle, takže je možno pracovat s velkými soubory vzorků. I když DRS měla problém se “stabilitou” výsledků při měření různých šarží, její výsledky v rámci jedné šarže skutečně ukazovaly na jednotlivé tablety s velmi odlišným složením. Ověřením je již dříve uváděná korelace mezi výsledky z DRS a HPLC stanovením obsahu paracetamolu. Nedestruktivnost a hlavně rychlost zaručuje DRS analýze tablet analgetika přívlastek nejrychlejší z použitých metod. Výsledky DRS zjištěné v této práci nasvědčují tomu, že u jednosložkových či dvousložkových léčiv by metoda podala patrně ještě lepší výsledky.

Jednou z možných alternativ, které by se daly použít ke sledování obsahové stejnoměrnosti, je patrně transmisní NIR spektroskopie. Tu jsem bohužel v rámci této práce nemohl vyzkoušet, ale jak ukazuje výsledek DRS, specifické vlastnosti povrchu tablety silně ovlivňují reflexní měření. Tento vliv by se při transmisním měření měl potlačit “zprůměrováním” vlastního povrchu a objemnějšího vnitřku lékové formy.

Z perspektiv XRD zmiňovaných v předešlé podkapitole je jisté, že XRD díky možnostem automatického dávkovače vzorků a rychlým detektorům by se též hodila ke stanovení obsahové stejnoměrnosti.

## 5. Závěr

Provedl jsem testování kvantitativní analýzy tříložkového analgetika běžně dostupného na českém trhu metodami analýzy pevné fáze. Cílem bylo ověření analytických metod, které lze považovat za vývojové, takže šlo o první provádění těchto analýz nikoli o jejich optimalizaci.

Nejdůležitější závěry lze shrnout do následujících bodů:

- 1) Difúzně reflexní spektroskopie v UV oblasti je perspektivní metoda pro sledování obsahové stejnoměrnosti.
- 2) RTG prášková difrakce je perspektivní metodou na kvantitativní analýzu složení pevných lékových forem. Texturní vlivy lze odstranit snadnou mechanickou úpravou tablety, ačkoli v literatuře se v tomto směru setkáváme spíše se skepsí.
- 3) Roztoková UV–Vis spektroskopie a IR spektroskopie při analýze pevné lékové formy s využitím multilineární regrese se obejde separováním složek. Multilineární analýza umožnila zatím spíše semikvantitativní analýzu. Příprava vzorků pro IR se musí optimalizovat, aby se mohla přesnost a správnost metody vylepšit.

Vzhledem k tomu, že uvedené metody byly užity poprvé, přesnost a správnost pod 10 relativních procent považuji za úspěch. Po provedení optimalizace a validace je velmi pravděpodobné, že výsledky by se podstatně zlepšily. Získané výsledky dávají velkou perspektivu pro praktické využití v blízké budoucnosti.

## 6. Použitá literatura

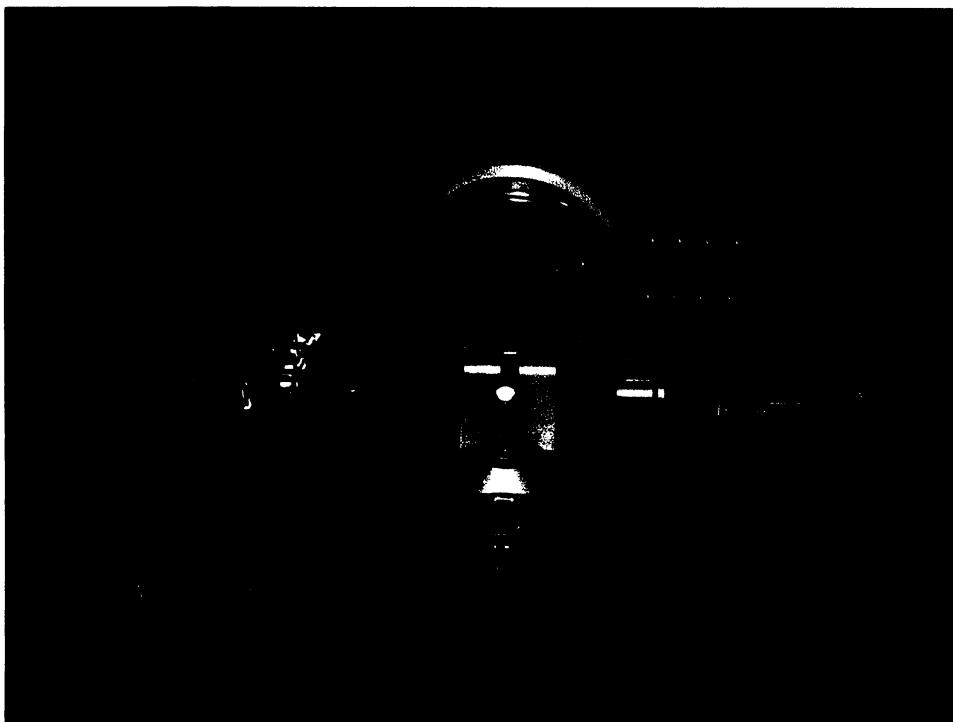
- [1] Klimeš J., *Kontrola léčiv I*, Praha, Karolinum 2002
- [2] Český lékopis 2005, Praha, Grada 2005
- [3] Evropský lékopis 2005
- [4] Phadnis N.V., Cavatur R.K., Suryanarayanan R., *J. Pharm. Biomed. Anal.* 15 (1997) 929
- [5] Iyengar S.S., Phadnis N.V., Suryanarayanan R., *Powder Diffr.* 16 (2001) 20
- [6] Fukuoka E., Makita M., Yamamura S., *Chem. Pharm. Bull.* 41 (1993) 595
- [7] Kratochvíl B., Hušák M., Jegorov A., *Chem. Listy* 96 (2002) 330
- [8] Yamamura S., Momose Y., *Int. J. Pharm.* 212 (2001) 203
- [9] Bugay D.E., Newman A.W., Findlay W.P., *J. Pharm. Biomed. Anal.* 15 (1996) 49
- [10] Stephenson G.A., Forbes R.A., Reutzel-Edens S.M., *Adv. Drug Deliv. Rev.* 48 (2001) 67
- [11] Bugay D. E., *Adv. Drug Deliv. Rev.* 48 (2001) 43
- [12] Blanco M., Coello J., Iturriaga H., MasPOCH S., de la Pezuela C., *Analyst* 123 (1998) 135R
- [13] Roston, D.A., Walters M.C., Rhinebarger R.R., Ferro L.J., *J. Pharm. Biomed. Anal.* 11 (1993) 293
- [14] Sarver R.W., Meulman P.A., Bowerman D.K., Havens J.L., *Int. J. Pharm.* 167 (1998) 105
- [15] Agatonovic-Kustrin S., Tucker I.G., Schmierer D., *Pharm. Res.* 16 (1999) 1477
- [16] Newman, A., W., Byrn S.R., *Drug Discov. Today* 8 (2003) 898
- [17] Fuller M.P., Griffiths P.R., *Anal. Chem.* 50 (1978) 1906
- [18] Sánchez F.C., Toft J., Van Den Bogaert B., Massart D.L., Dive S.S., Hailey P., *Fresenius J. Anal. Chem.* 352 (1995) 771
- [19] Blanco M., Bañó R. G., Bertran E., *Talanta* 56 (2002) 203
- [20] Churáček J., *Nové trendy v teorii a instrumentaci vybraných analytických metod*, Praha, Academia 1993

- [21] Eustaquio A., Blanco M., Jee R. D., Moffat A. C., *Anal. Chim. Acta* 383 (1999) 283
- [22] Dempster M.A., MacDonald B.F., Gemperline P.J., Boyer N.R., *Anal. Chim. Acta* 310 (1995) 43
- [23] Blanco M., Eustaquio A., González J. M., Serrano D., *J. Pharm. Biomed. Anal.* 22 (2000) 139
- [24] Hlavay J., Inczedy J., *Spectroc. Acta Pt. A-Molec. Biomolec. Spectr.* 41 (1985) 783
- [25] Plugge W., Van Der Vlies C., *J. Pharm. Biomed. Anal.* 11 (1993) 435
- [26] Corti P., Ceramelli G., Dreassi E., Mattii S., *Analyst* 124 (1999) 755
- [27] Donoso, M., Kildsig D.O., Ghaly E.S., *Pharm. Dev. Technol.* 8 (2003) 357
- [28] Bunaciu A.A., Aboul-Enein H.Y., Fleschin Ş., *Il Farmaco* 60 (2005) 33
- [29] Moreira A.B., Dias I.L.T., Neto G.O., Zagatto E.A.G., Kubota L.T., *Anal. Lett.* 39 (2006) 349
- [30] Holzbecher Z., Churáček J., *Analytická chemie*, Praha, SNTL/ALFA 1987
- [31] Horák M., Vitek A., *Zpracování a interpretace vibračních spekter*, Praha, SNTL 1980
- [32] Taylor L.S., Langkilde F.W., *J. Pharm. Sci.* 89 (2000) 1342
- [33] Němcová I., Rychlovský P., *Spektrometrické analytické metody I*, 2. vydání Praha, Karolinum 2004
- [34] Burger T, Ploss H.J., Kuhn J., Ebel S., Fricke J., *Appl. Spectrosc.* 51 (1997) 1323
- [35] Trafford, A.D., Jee R.D., Moffat A.C., Graham P., *Analyst* 124 (1999) 163
- [36] Zelkó, R., Antal I., Dredán J., Dávid A. Z., Rácz I., *STP Pharma Sci.* 10 (2000) 210
- [37] Al-Zoubi N., Koundourellis J.E., Malamataris S., *J. Pharm. Biomed. Anal.* 29 (2002) 459
- [38] Koradia V., Chawla G., Bansal A.K., *Acta Pharm.* 54 (2004) 193
- [39] Forina M., Casolino M.C., De La Pezuela Martinez C., *J. Pharm. Biomed. Anal.* 18 (1998) 21
- [40] Blanco M., Coello J., Iturriaga H., MasPOCH S., De La Pezuela C., *Talanta* 40 (1993) 1671

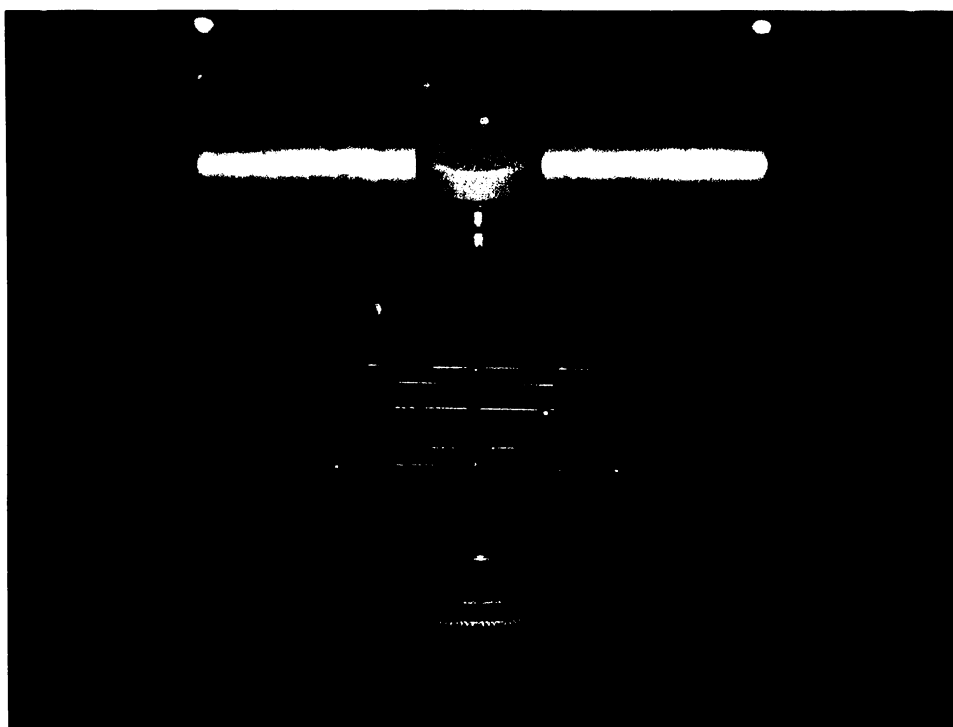
- [41] Blanco M., Coello J., Eustaquio A., Iturriaga H., MasPOCH S., *Anal. Chim. Acta* 392 (1999) 237
- [42] Blanco M., Coello J., Iturriaga H., MasPOCH S., De La Pezuela, *Anal. Chim. Acta* 333 (1996) 147
- [43] Bandyopadhyay R., Selbo J., Amidon G. E., Hawley M., *J. Pharm. Sci.* 94 (2005) 2520
- [44] Koivisto M., Heinänen P., Tanninen V.P., Lehto V.-P., *Pharm. Res.* 23 (2006) 813
- [45] Kratochvíl, B., Jenšovský, L., Úvod do krystalochemie, Praha, SNTL 1987
- [46] Cooper V.B., Pearce G.E.S., Petts C.R., *J. Pharm. Pharmacol.* 55 (2003) 1323
- [47] Suryanarayanan R., Herman C.S., *Int. J. Pharm.* 77 (1991) 287
- [48] Bergese P., Colombo I, Gervasoni D, Depero LE, *J. Appl. Crystallogr.* 36 (2003) 74 Part 1
- [49] Scarlett N.V.Y., Madsen I.C., Cranswick L.M.D., Lwin T., Groleau E., Stephenson G., Ayulmore M., Agron-Olshina N., *J. Appl. Crystallogr.* 35 (2002) 383
- [50] Koivisto M., Virjonen T., Heikkilä T., Lehto V.-P., *J. Pharm. Biomed. Anal.* 36 (2004) 559
- [51] Bergese P., Bontempi E., Colombo I., Depero L.E., *J. Appl. Crystallogr.* 34 (2001) 663
- [52] Kraus W., Nolze G., *J. Appl. Crystallogr.* 29 (1996) 301
- [53] Ševčík J.G.K., Metodologie měření v analytické chemii, Praha, Karolinum 1996
- [54] Blanco M., Coello J., Gonzalez F., Iturriaga H., MasPOCH S., Tomas X., *J. Pharm. Biomed. Anal.* 12 (1994) 509
- [55] Blanco M., Coello J., Iturriaga H., MasPOCH S., Alaoui-Ismaili S., *Anal. Lett.* 32 (1999) 1169
- [56] [http://www.chem.uni-potsdam.de/~thomas/modules.php?op=modload&name=PagEd&file=index&page\\_id=444](http://www.chem.uni-potsdam.de/~thomas/modules.php?op=modload&name=PagEd&file=index&page_id=444)
- [57] Böhm S., Smrčková-Voltrová S., Strukturní analýza organických sloučenin, Praha, VŠCHT 1995



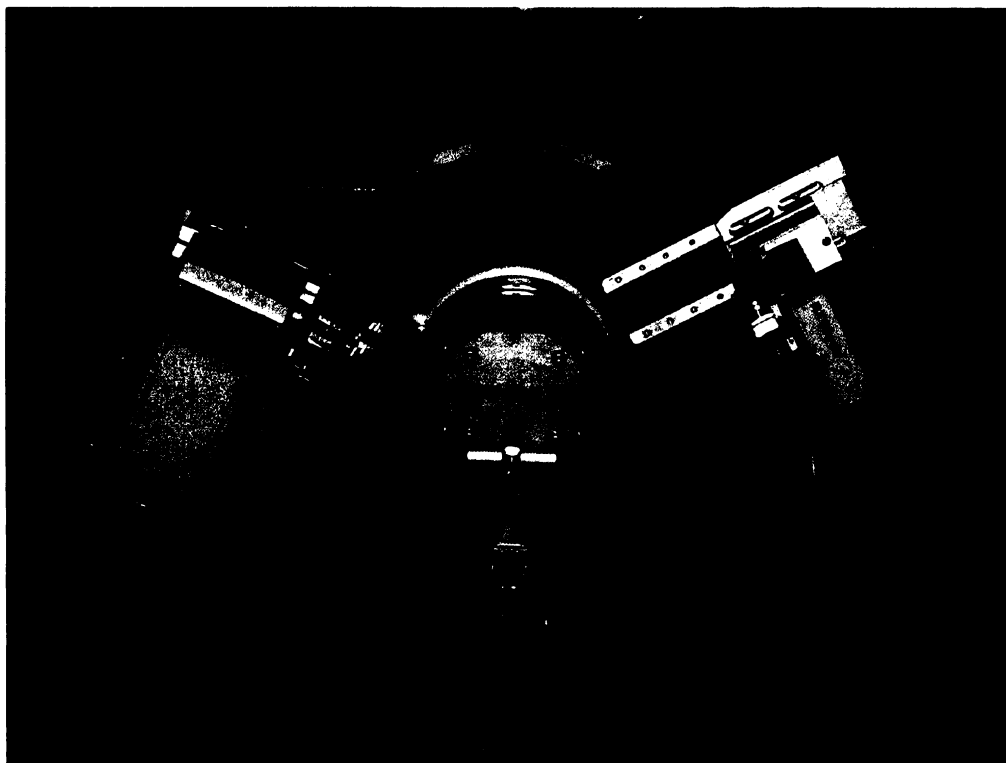
## 7. Přílohy



Obrázek 30: Ukázka správného umístění tablety na držák v difraktometru za použití mikroskopu.



Obrázek 31: Najustovaná tableta na držáku goniometru v difraktometru.



Obrázek 32: Pohled do difraktometru po skončení měření tablety analgetika.