

VETERINÁRNÍ A FARMACEUTICKÁ UNIVERZITA BRNO

FARMACEUTICKÁ FAKULTA

Ústav aplikované farmacie



**APLIKÁCIA MODERNÝCH METÓD A POSTUPOV
V ZABEZPEČOVANÍ KVALITY LIEČIV A LIEKOV**

Dizertačná práca

Ing. Erika Bojňanská

Brno 2017

Vedúci dizertačnej práce:

Prof. PharmDr. Josef Jampílek, Ph.D.

Abstrakt

Staré a staršie schválené a registrované liečivá a lieky sa analyzujú schválenými metódami vtedy používanými pri ich registrácii, z toho dôvodu ich špecifikácie nemôžu obsahovať moderné analytické metódy, ako sú, napríklad, analýzy v pevnej fáze. Preto naozaj kritické parametre, ktoré skutočne ovplyvňujú kvalitu finálneho produktu nemusia byť v špecifikácii definované. To sa môže stať veľkým problémom, keď sa zmení zdroj liečiva, miesto výroby alebo výrobné zariadenia. Účelom tejto práce bolo vykonať troubleshooting, respektíve nájsť kritické kvalitatívne atribúty surovín, ktoré ovplyvňujú kvalitu lieku; boli sledované vplyvy excipientov na degradáciu liečiva a stabilitu finálnej liekovej formy, hodnotenie možnosti krížovej kontaminácie z predchádzajúcich procesov vo výrobe, identifikácia neznámych nečistôt a stanovenie kritických parametrov liečiva s cieľom navrhnúť dostatočne robustnú špecifikáciu účinnej látky. Na analýzy boli použité metódy bežne používané v laboratóriách kontroly kvality ako sú separačné metódy, stanovenie obsahu vody, disolúcie, tak aj sofistikovanejšie metódy pevnej fázy.

Kľúčové slová

kritické atribúty kvality; kontrola kvality; účinná látka; finálna lieková forma; farmaceutická analýza

Abstract

Active pharmaceutical ingredients (APIs) and pharmaceuticals approved and registered relatively long ago are analysed by approved methods used for their registration; so their specifications cannot contain advanced analytical methods, such as solid-state analytical techniques. Therefore, really critical parameters that actually affect the quality of the final product cannot be defined in the specification. This can become a major problem when changing the API source, place of production or production facilities. The purpose of this work was to perform troubleshooting or find critical qualitative attributes of raw materials that influence the quality of the product. Therefore, this PhD thesis investigates the influence of excipients on drug degradation and the stability of the final dosage form, the possibility of cross contamination from previous processes in production, the identification of unknown impurities and the determination of critical drug parameters in order to propose a sufficiently robust specification of the active substance. For the analyses, methods commonly used in quality control laboratories such as chromatography and separation techniques methods, determination of water content, dissolution and more sophisticated solid-state methods were used.

Keywords

Critical Quality Attributes; Quality Control; Active Pharmaceutical Ingredient; Final Dosage Form; Pharmaceutical Analysis

Prehlasujem, že som predkladanú dizertačnú prácu vypracovala samostatne pod odborným vedením vedúceho dizertačnej práce s použitím zdrojov uvedených v zozname.

V Brne 16. 10. 2017

.....

Ing. Erika Bojňanská

Na tomto mieste by som sa rada poďakovala všetkým, ktorí sa podieľali na úspešnom dokončení tejto dizertačnej práce. Poďakovanie patrí predovšetkým prof. PharmDr. Josefovi Jampílkovi, Ph.D. za praktické rady pri navrhovaní metodiky práce a za odborné vedenie, užitočné nápady, vecné a cenné pripomienky, záujem, trpezlivosť a čas, ktorý mi venoval v priebehu vypracovávaní práce.

Tiež by som chcela poďakovať kolegom zo Saneca Pharmaceuticals, a.s. v Hlohovci za akúkoľvek pomoc a podporu počas štúdia i pri realizácii niektorých stanovení experimentálnej časti práce. Rada by som chcela tiež poďakovať doc. Ing. Martinovi Pisárčikovi, CSc. z Farmaceutickej fakulty UK v Bratislave, Ing. Tomášovi Opravilovi, Ph.D. z Fakulty chemickej VUT Brno a Mgr. Michalovi Oravcovi, Ph.D. z Ústavu výzkumu globálnej zmeny AV ČR v Brne za možnosť využívať ich prístrojové vybavenia a poskytnutí cenných informácií a vzácneho času pri konzultovaní otázok súvisiacich so skúmanou problematikou.

Túto prácu venujem svojej rodine, pretože vďaka nim a vďaka ich pomoci som mohla študovať. Svojej dcére ďakujem za inšpiráciu.

Obsah

ZOZNAM POUŽITÝCH SKRATIEK A SYMBOLOV	8
1 ÚVOD A CIEĽ	11
2 TEORETICKÁ ČASŤ	13
2.1 Prehľad legislatívy	13
2.2 Regulácia	19
2.3 Analytické metódy	21
2.3.1 Stanovenie obsahu vody	24
2.3.1.1 Gravimetrické stanovenie vody	24
2.3.1.2 Titračné stanovenie vody metódou podľa K. Fischera	25
2.3.1.3 Titračné stanovenie vody coulometrickou metódou	25
2.3.2 Spektrálne metódy	26
2.3.3 UV-VIS spektrofotometria	29
2.3.4 IR spektrometria	30
2.3.5 Fluorescenčná spektrometria	36
2.3.6 Chromatografia	36
2.3.6.1 Vysokoučinná kvapalinová chromatografia	38
2.3.7 Hmotnostná spektrometria	42
2.3.7.1 Iónové zdroje	44
2.3.7.2 Hmotnostné analyzátory	46
2.3.7.3 Detekcia iónov	48
2.3.7.4 Štruktúrna analýza pomocou hmotnostnej spektroskopie vo farmácii	49
2.3.8 Termická analýza	49
2.3.8.1 Vyhodnocovanie DSC kriviek	52
2.3.9 Analýza veľkosti a tvaru častíc	52
2.3.10 Špecifický povrch častíc	56
2.3.11 Zmäčavosť a kontaktný uhol	58

2.3.12	Röntgenová difrakcia	61
2.3.13	Disolúcia	65
2.3.14	Zeta potenciál.....	70
3	EXPERIMENTÁLNA ČASŤ	73
3.1	Popis použitých prístrojov a metód.....	73
3.1.1	Fluorimetrický spektrometer.....	73
3.1.2	Infračervená spektroskopia v blízkej oblasti	73
3.1.3	Disolúcia s UV–VIS spektrofotometrom.....	73
3.1.4	Obsah vody	74
3.1.5	Vysokoučinná kvapalinová chromatografia	74
3.1.6	Hmotnostná spektrometria	74
3.1.7	RTG prášková difrakcia.....	74
3.1.8	Diferenčná skenovacia kalorimetria	75
3.1.9	Meranie veľkosti častíc	75
3.1.10	Skenovacia elektrónová mikroskopia	75
3.1.11	Špecifický povrch	75
3.1.12	Kontaktný uhol a zmáčavosť	76
3.1.13	Zeta potenciál.....	76
3.2	VÝSLEDKY A DISKUSIA.....	77
3.2.1	Prípadová štúdia 1 — Hodnotenie excipientu	77
3.2.2	Prípadová štúdia 2 — Vplyv excipientov na stabilitu liekovej formy.....	79
3.2.3	Prípadová štúdia 3 — Vplyv cudzorodých nečistôt na stabilitu liekovej formy...96	
3.2.4	Prípadová štúdia 4 — Vplyv API na finálny produkt.....	138
4	ZÁVER.....	161
5	ZOZNAM PUBLIKOVANÝCH PRÁC	163
6	ZOZNAM POUŽITEJ LITERATÚRY	164

ZOZNAM POUŽITÝCH SKRATIEK A SYMBOLOV

APCI	chemická ionizácia za atmosferického tlaku (Atmospheric Pressure Chemical Ionization)
API	účinná látka (aktívna farmaceutická ingrediencia)
APPI	fotoionizácia za atmosferického tlaku (Atmospheric Pressure Photoionization)
BCS	biofarmaceutický klasifikačný systém (Biopharmaceutical Classification System)
BES	bioekvivalenčné štúdie (Bioequivalence studies)
BET	stanovenie špecifického povrchu pomocou metódy BET (Brunauer, Emmett a Teller)
CCD	(Charge Coupled Device)
CE-MS	kapilárna elektroforéza–hmotnostná spektrometria (Capillary Electrophoresis–Mass Spectrometry)
cGMP	(Current Good Manufacturing Practice)
CI	chemická ionizácia (Chemical Ionization)
CMAs	kritické vlastnosti materiálu (Critical Material Attributes)
CPPs	kritické parametre procesu (Critical Process Parameters)
CQAs	kritické vlastnosti kvality (Critical Quality Attributes)
DSC	diferenčná skenovacia kalorimetria (Differential Scanning Calorimetry)
DTA	diferenčná termická analýza (Differential Thermal Analysis)
DTGA	diferenčná termogravimetria (Differential Thermogravimetric Analysis)
EI	elektrónová ionizácia (Electron Ionization)
EMSC	rozšírená multiplikatívna korekcia signálu (Extended Multiplicative Signal Correction)
ESI	ionizácia elektrosprejom (Electrospray Ionization)
FAB, FIB	ionizácia urýchlenými atómami alebo iónmi
FDA	Správa potravín a liečiv (Food and Drug Administration)
FFR	rýchle otáčanie poľa (Fast Field Reversal)
FIR	d'aleká infračervená (Far Infrared)
FT-ICP	Iónová cyklotrónová rezonancia s Fourierovou transformáciou (Fourier Transform – Ion Cyclotron Resonance)
GC	plynová chromatografia (Gas Chromatography)
GC-MS	plynová chromatografia s hmotnostným spektrometrom (Gas chromatography–mass spectrometry)

GLS	všeobecná metóda najmenších štvorcov (Generalize Least Squares)
GMP	správna výrobná prax (Good Manufacturing practise)
ΔH	zmenaentalpie
HPLC	vysokoúčinná kvapalinová chromatografia (High Performance Liquid Chromatography)
ICH	International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use
ICR	iónová cyklotrónová rezonancia (Ion Cyclotron Resonance)
IČ	infračervená
IR	infračervená (infrared)
LC-HRMS	kvapalinová chromatografia s hmotnostným spektrometrom s vysokým rozlíšením (Liquid chromatography–high resolution mass spectrometry)
LC-MS	kvapalinová chromatografia s hmotnostným spektrometrom (Liquid chromatography–mass spectrometry)
M3-PALS	fázová analýza rozptylu svetla (Phase Analysis Light Scattering)
MALDI	ionizácia laserom za účasti matrice (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization)
MIR	stredná oblasť IČ (mid-infrared)
MS	hmotnostná spektrometria (Mass Spectroscopy)
MSC	viacnásobná bodová korekcia (Multiplicative Scatter Correction)
n.d.	nedetekované (not detected)
NIR	blízka oblasť IČ (near-infrared)
NMR	nukleárna magnetická rezonancia (Nuclear Magnetic Resonance)
OOS	výsledok mimo špecifikáciu (Out of Specification)
PALS	Fázová analýza rozptylu svetla (Phase Analysis Light Scattering)
PAT	procesná analytická technológia (Process Analytical Technology)
PCA	analýza hlavných komponentov (Principal Components Analysis)
PDA	diódový detektor (Photodiode Array Detector)
Ph. Eur.	Európsky liekopis, (European Pharmacopoeia)
ppm	parts per million (0,0001 %)
psi	pound-force per sq. inch (1 bar = 14,504 psi)
PTFE	polytetrafluoroetylénový membránový filter (polytetrafluoroethylene membrane filters)
PXRD	prášková difrakcia (Powder X-Ray Diffraction)
RTG	Röntgenová difrakcia

QA	zabezpečovanie kvality (Quality Assurance)
QbD	návrh kvality (Quality by Design)
QC	kontrola kvality (Quality Control)
QqQ	Trojité kvadrupólový analyzátor (Triple quadrupole)
RP	obrátaná fáza (Reversed Phase)
rpm	otáčky za minútu (rotation per minute)
RRT	relatívny retenčný čas (Relative Retention Time)
RSD	relatívna štandardná odchýlka (Relative Standard Deviation)
RT	retenčný čas (Retention Time)
SEM	rastrovací elektronový mikroskop (Scanning Electron Microscope)
SFR	pomalé otáčanie poľa (Slow Field Reversal)
SD	štandardná odchýlka (Standard Deviation)
S/N	pomer signál – šum (signal/noise)
SNV	štandardná normálna variácia (Standard Normal Variate)
SOP	štandardný operačný postup (Standard Operating Procedure)
SPKL	správna prax v kontrolnom laboratóriu
SSA	špecifická povrchová plocha (Specific Surface Area)
SVP	správna výrobná prax
TGA	termogravimetrická analýza
THz	Terahertzová
TMA	termomechanická analýza (Thermomechanical Analysis)
TOF	analyzátor doby letu (Time of Flight)
TSI	ionizácia termosprejom (Therospray Ionization)
UHPLC	ultraúčinná kvapalinová chromatografia (Ultra High Performance Liquid Chromatography)
USP-NF	U.S. Pharmacopoeia National Formulary
UV	ultrafialová (Ultraviolet)
UV-VIS	ultrafialové a viditeľné (Ultraviolet, Visible)
WHO	Svetová zdravotnícka organizácia (World Health Organization)
λ [m]	vlnová dĺžka žiarenia
XRD	difrakcia na monokryštále (X-Ray Diffraction)

1 ÚVOD A CIEĽ

V minulosti bol vývoj liečiv primárne založený na báze empirických dát. V dnešnej dobe je farmaceutický vývoj založený na systematickom prístupe a to znamená, že proces by mal byť pochopený a aj nepatrná zmena niektorých parametrov aktívnych farmaceutických látok (API) použitých vo formulácii liekových foriem, hoci spĺňajú špecifikáciou požadované parametre, môže mať dopad na výsledný produkt.

Liečivé látky tak ako aj API a pomocné látky podliehajú prísnyim pravidlám štátneho dozoru. Aby nebol pacient ohrozený, sú zadefinované prísne kritériá, ktoré sú kodifikované aj na medzinárodnej úrovni.

Samotný výstup analýzy je vyjadrený v merateľnom vyhodnotení. Musí to byť kvantifikovateľná veličina, ktorá je hodnotená analytickými metódami. Používané metódy musia byť validované, registrované, meranie sa prevádza na zariadeniach, ktoré sú kvalifikované v pravidelných intervaloch školenými pracovníkmi priamo z farmaceutickej firmy, alebo zmluvným partnerom za použitia certifikovaných štandardov a meradlami, ktoré sú naviazané na štátny etalón.

Laboratória, ktoré vyvíjajú lieky pre ľudí, zabezpečujú klinické štúdie musia mať všetky postupy v zmysle správnej výrobnéj praxe (SVP), ktorej časťou je aj správna prax v kontrolných laboratóriu (SPKL). Nakoľko sú vyvíjané a do praxe zavádzané lieky stále účinnejšie, je aj ich vplyv na pacientov pri nesprávnom posúdení toxickejší. Z dôvodu ochrany pacienta sa v medzinárodnom meradle stále sprísňujú kritériá na posudzovanie všetkých vstupov a výstupov z farmaceutickej firmy smerom k pacientovi. Takisto napreduje vývoj citlivejších metód a prístrojovej techniky na ich aplikáciu.

Pomocou viacerých analytických metód sa hodnotí aj v tejto práci či sú všetky parametre v zhode so predpísanou špecifikáciou, ale sú aj rôzne prípady, ktoré sú neštandardné oproti kvalite finálnej špecifikácie, kde sa zisťuje čo je problematické a aký to má potenciálny dopad na výslednú kvalitu lieku.

Dobrá farmaceutická kvalita predstavuje akceptovateľné nízke riziká pre pacienta vzhľadom na požadovaný klinický efekt. Dôvody prečo monitorovať a kontrolovať kvalitu je v prvom rade bezpečnosť pacientov, dôvera vo výrobný proces a s tým súvisiaca dôvera v produkt.

V tejto práci som sa venovala hodnoteniu viacerých skupín a oblastí, ktoré vstupujú do výrobného procesu a majú dopad na kvalitu finálnej liekovej formy. Sledovala som excipient pomocou spektrálnej metódy za použitia metódy popísanej v liekopise

a jej porovnanie s jednoduchšou neliekopisnou metódou, vplyv excipientov na stabilitu finálnej liekovej formy a návrh experimentu na sledovanie vplyvu jednotlivých excipientov na stupeň degradácie API a nárast neznámej nečistoty metódami HPLC a DSC, vplyv cudzorodých nečistôt na stabilitu finálnej liekovej formy, možnosť krížovej kontaminácie z predchádzajúcich procesov vo výrobe za použitia metód HPLC, LC-MS, vplyv API na finálny produkt — stanovenie kritických parametrov API ako je polymorfizmus, zmáčavosť — kontaktný uhol vody, zeta potenciál, veľkosť a tvar častíc, špecifický povrch častíc, a využila som aj NIR spektroskopiu a hľadala korelácie medzi jednotlivými vzorkami a nameranými hodnotami inými analytickými technikami.

V dizertačnej práci sú riešené prípady z reálnej praxe, a pretože materiál diskutovaný vo výsledkovej časti je duševným vlastníctvom farmaceutickej firmy, sú názvy analyzovaných účinných látok uvádzané pod kódmi.

2 TEORETICKÁ ČASŤ

2.1 PREHĽAD LEGISLATÍVY

V úvode teoretickej časti je dôležité zadefinovať základné pojmy ako je liek, liečivo, pomocná látka. Sú to každodenné vstupy do laboratórií, ktoré potom ovplyvňujú konečný výstup z farmaceutickej firmy ku konečnému pacientovi.

Liečivo je chemicky jednotná alebo nejednotná látka ľudského, rastlinného, živočíšneho alebo chemického pôvodu, ktorá je nositeľom biologického účinku využiteľného na ochranu pred chorobami, na diagnostiku chorôb, liečenie chorôb alebo na ovplyvňovanie fyziologických funkcií.¹

Pomocná látka je chemicky jednotná alebo nejednotná látka, ktorá v množstve použitom na výrobu lieku alebo na prípravu lieku sama nemá terapeutický účinok, ale umožňuje alebo uľahčuje výrobu lieku alebo prípravu lieku, jeho podávanie, zlepšuje jeho kvalitu alebo stabilitu a biologickú dostupnosť.¹

Liek je liečivo alebo zmes liečiv a pomocných látok, ktoré sú upravené technologickým procesom do liekovej formy a sú určené na ochranu pred chorobami, na diagnostiku chorôb, liečenie chorôb alebo na ovplyvňovanie fyziologických funkcií.¹

Originálny liek je nový liek, ktorý obsahuje novú účinnú látku. Originálny liek získava patentovú ochranu a trhovú exkluzivitu na určitú dobu. Od prvého patentovania molekuly liečiva je potrebné vykonať veľa skúšok na preukázanie účinnosti, bezpečnosti až potom môže byť liek uvedený na trh. Taktiež sú počas prvých rokov chránené aj určité dáta z klinických skúšaní.

Generický liek je liek, ktorý má rovnaké kvalitatívne (t.j. totožnú účinnú látku) a kvantitatívne (t.j. rovnaká dávka liečiva) zloženie a rovnakú liekovú formu ako referenčný humánny liek (napr. originál) a ktorého biologická rovnocennosť s referenčným liekom bola dokázaná primeranými skúškami biologickej dostupnosti. Generický liek môže byť registrovaný a uvedený na trh až po skončení platnosti patentu originálneho lieku.

S účinnosťou zákona č. 362/2011 skončila záväznosť a vydávanie Slovenského liekopisu. V platnosti zostáva Európsky liekopis a Slovenský farmaceutický kódex.² V súčasnosti (od 1. januára 2017) je v platnosti Európsky liekopis Ph.Eur. Vydanie 9, Doplnok 9.1.³ Je to súbor technických požiadaviek na prípravu, výrobu, označovanie, uchovávanie liečiv, pomocných látok, liekových foriem a na hodnotenie ich kvality. Európsky liekopis je výsledkom práce desiatok expertov pôsobiacich v širokom spektre

medzinárodných odborných skupín začlenených v Európskej liekopisnej komisii. Pripravuje sa pod ochranou Rady Európy v súlade s Dohovorom o vypracovaní Európskeho liekopisu (European Treaty Series No. 134), podpísaným 38 signatármi. Zmluvné strany prijali opatrenia potrebné na zabezpečenie toho, že články Európskeho liekopisu sa stanú platnými normami používanými na ich vlastnom území.² Účelom liekopisu je podieľať sa na ochrane zdravia tým, že obsahuje záväzné normy na posúdenie kvality liečiv a liekov, ktoré musia dodržiavať všetci pracovníci, ktorí s liečivami a liekmi v akejkol'vek podobe zaobchádzajú. Stanovená kvalita je jednou zo základných záruk bezpečnosti liekov pre pacientov a iných užívateľov.²

Všetky klinické ako aj výrobné šarže, ktoré sú určené pre pacienta je nutné vyrábať a takisto aj analyzovať v zmysle súborných predpisov pod skratkou správnej výrobnéj praxe SVP — „Good Manufacturing Practise“ (GMP). SVP — správna výrobná prax je súbor požiadaviek na zabezpečenie výroby a kontroly kvality liekov v súlade s účelom použitia liekov a v súlade s príslušnou dokumentáciou o výrobných a kontrolných postupoch.¹ Zjednodušene povedané, SVP je súbor takých pravidiel uplatňovaných vo výrobe a kontrole liekov, ktoré umožňujú opakovane vyrobiť liek účinný, bezpečný a kvalitný. Keďže farmaceutický priemysel vyrába špeciálny druh produktov a to lieky, ktoré sú určené na liečenie chorých ľudí alebo miernenie príznakov chorôb (v menšej miere na diagnostikovanie rôznych ochorení) tak je kladený dôraz práve na dodržiavanie súboru predpisov SVP. To zabezpečí aby počas celej doby použiteľnosti bola zaručená účinnosť. Pretože sa na účinok lieku spolieha bezvýhradne ako pacient tak aj lekár. Nie je možné použiť metódy úplnej kontroly kvality, hodnotia sa iba vlastnosti „reprezentatívnej“ vzorky — hodnotí sa len niekoľko málo desiatok tabliet hoci jednu šaržu tabliet môže napríklad tvoriť aj viac ako 1 000 000 jedincov. Vyrába sa mnoho druhov produktov na tých istých zariadeniach, v tých istých priestoroch GMP umožňuje vykonávať analytické práce štandardným, reprodukovateľným spôsobom a zabezpečuje dosiahnutie spoľahlivých výsledkov.

Zákon 362/2011 z 13.septembra 2011, v znení neskorších novelizácií a zákonov, o liekoch a zdravotníckych pomôckach (Tretí oddiel: Výroba liekov, § 12) obsahuje 9 základných častí, ktoré pojednávajú priamo o liekoch:⁴

- Základné ustanovenia
- Zaobchádzanie s liekmi a zdravotníckymi pomôckami

- Humánne lieky
- Veterinárne lieky
- Zdravotnícke pomôcky
- Predpisovanie, výdaj a podávanie
- Výkon štátneho dozoru a štátna správa na úseku farmácie
- Sankcie
- Spoločné, prechodné a záverečné ustanovenia

Ďalší dokument, ktorý upravuje nakladanie s farmaceutickými prípravkami je Vyhláška Ministerstva zdravotníctva Slovenskej republiky Z. z. č. 128/2012 z 21. marca 2012 o požiadavkách na správnu výrobnú prax a požiadavkách na správnu veľkodistribučnú prax. Táto Vyhláška popisuje v jednotlivých paragrafoch:⁵

- § 1 Požiadavky na správnu výrobnú prax kde pojednáva o výrobných predpisoch, validácii výroby a metód, kvalifikovaných zamestnancoch, vybavenosti pracoviska, správnom skladovaní, vykonávaní kontrolných skúšok, vedení písomnej dokumentácie, pláne stiahnutia lieku z obehu, zisťovaní príčin reklamácií a prijímanie nápravných opatrení.
- § 2 Kontrolu kvality kde je zadefinovaný pojem kontrolné laboratórium, osoba nezávislá od výroby, analýzy môžu vykonávať aj zmluvné laboratóriá podľa špecifikácií, pravidlá pre uchovávanie protivzoriek, vydávanie atestu o kontrole a mikrobiologickej kontrole kontaminácie priestorov výroby.
- § 3 Personálne zabezpečenie definuje nezávislosť odborného zástupcu zabezpečovania kvality od odborného zástupcu výroby a od vedúcich zamestnancov, správne obsadenie organizačnej štruktúry, školenia pracovníkov.
- § 4 Priestorové vybavenie popisuje správny dizajn priestorov — aby boli vhodné na daný účel pri zabezpečení minimalizácie krížovej kontaminácie, oddelené uzavreté priestory pre antibiotiká, hormóny, rádioaktívne, biotechnológie, vysokotoxické, infekčné látky.
- § 5 Zariadenia, stroje a prístroje musia byť vhodné na daný účel, s vylúčením zámeny, kontaminácie, vynechania stupňov, čistiteľné, prípadne sterilizovateľné, s príslušnou dokumentáciou, kalibráciou, validáciou a označovaním.
- § 6 Výroba liekov musí prebiehať podľa schválených postupov s vykonaním validácie, prípadne revalidácie kritických krokov, aktualizácia dokumentácie najmenej každých 5 rokov podľa súčasných vedeckých poznatkov. Pre výrobu liekov pre klinické testovanie musí byť zabezpečené zamedzenie zámen pri „zašifrovaní“.

- § 7 Dokumentácia musí pozostávať z výrobného predpisu, špecifikácie, výrobného/baliaceho príkazu pre samotnú výrobnú šaržu, všeobecne platné predpisy sú popísané v štandardných operačných postupoch, záznamoch o šarži, dodržiavanie princípov SVP, ako sa postupuje s vyradenými šaržami, musí byť zrozumiteľná, bezchybná, aktuálna, za každých okolností musí byť možnosť spätnej rekonštrukcie udalostí. Archivácia dokumentácie musí byť počas doby expirácie plus jeden rok alebo päť rokov od prepustenia, pre elektronické záznamy musí byť zabezpečená ich čitateľnosť počas celej doby archivácie
- § 8 Zmluvná výroba je ošetrená zmluvou o dodržaní SVP zo strany zhotoviteľa, ako zodpovedná osoba dodrží svoje povinnosti, ďalšie zadanie tretej strane len s písomným súhlasom.
- § 9 Označovanie skúšaného liečivého prípravku.
- § 10 Reklamácie a sťahovanie je nevyhnutné mať zavedený systém zaznamenávania a vyhodnocovania reklamácií a pri sťahovaní spoluprácu s distribútormi a lekárňami (preklinické šarže postup rýchleho odšifrovania).
- § 11 Kontrola dodržiavania SVP je zabezpečená kontrola dodržiavania SVP systémom vnútorných inšpekcií, záznamy z interných inšpekcií sú na vyžiadanie predkladané Štátnemu ústavu pre kontrolu liečiv ŠUKL

Farmaceutický systém kvality sa vyvíjal po krokoch. V súčasnosti je obdobie zjednocovacích procesov v rámci GMP rôznych oblastí systémov kvality ako je kvalita, bezpečnosť, účinnosť. Tieto aktivity sa súhrnne nazývajú procesom harmonizácie. Bol ustanovený tím expertov s cieľom medzinárodnej unifikácie systému kvality „International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use (ICH)“, ktorého prvé stretnutie sa uskutočnilo v apríli 1990. Táto organizácia okrem toho vydáva smernice a odporúčania vzťahujúce sa k vývoju a výrobe substancií a liekových foriem a harmonizuje požiadavky regulačných autorít USA, Európy a Japonska.

V rokoch 2011 — 2020 má za cieľ rozšíriť prínos harmonizácie aj mimo ICH región a to školeniami a aktívnou účasťou oblastí doteraz mimo ICH región, pri príprave a ďalšom vývoji smerníc. Súčasný stav ICH smerníc stručne popisuje Tabuľka 2.1.

Tabuľka 2.1 Zoznam ICH smerníc⁶

Kód smernice	Zameranie
Q1A — Q1F	Stability
Q2	Analytické validácie
Q3A — Q3D	Nečistoty
Q4 — Q4B	Liekopisy
Q5A — Q5E	Kvalita biotechnologických produktov
Q6A — Q6B	Špecifikácie APIs/liekových foriem
Q7	Správna výrobná prax
Q8	Farmaceutický vývoj
Q9	Quality Risk management
Q10	Farmaceutický systém kvality
Q11	Vývoj a výroba APIs
Q12	Technické a regulačné pokyny pre riadenie „životného cyklu“ farmaceutického produktu

Aplikovaním týchto smerníc do praxe a prepojením prístupu Q8⁷, Q9⁸, Q10⁹, Q11¹⁰ a Q12¹¹ hovoríme o návrhu kvality tzv. „Quality by Design“ (QbD). Je to aktívny prístup k vývoju produktov, sledovanie najnovších vedeckých údajov, s možnosťou rýchlej identifikácie hlavných príčin a riešenie akejkoľvek odchýlky počas životného procesu lieku. Slúži na lepšie pochopenie, zníženie a kontrolu možných príčin variability farmaceutických procesov. Rovnaké postupy je možné aplikovať aj pre analytické metódy, ak je výstupom reportovateľný výsledok.^{12,13}

Prístup QbD pre analytické metódy je vedecký prístup, ktorý na základe vyhodnotenia rizík využíva širokú základňu poznatkov (v porovnaní s tradičným vývojom metód, overovania a transferom) získaných v priebehu životného cyklu metódy. Najnovšie články diskutovali o tom, ako aplikovať QbD koncepty na analytické metódy.^{14,15} Dôraz sa kladie na stanovenie kritérií pre reportovateľné výsledky, ktoré budú výstupom metód, nasleduje výber techniky stanovenia a vývoj metódy na základe najnovších vedeckých dát so systematickým procesom identifikácie vhodných podmienok metódy.^{16,17,18}

QbD je moderným, vedeckým prístupom, formalizuje kvalitu produktu, automatizuje manuálne testovanie a zefektívňuje odstraňovanie problémov. Používa systematický prístup k zabezpečovaniu kvality tým, že sa venuje dôkladnému pochopeniu príspevku jednotlivých komponentov a procesov, ktoré ovplyvňujú konečnú kvalitu lieku. QbD poskytuje zadefinovanie a následne rýchlu identifikáciu všetkých kritických atribútov, parametrov procesu, už počas formulácie a procesu vývoja samotného lieku. V dôsledku toho

sa problémy s kvalitou môžu účinne analyzovať a hlavná príčina rýchlo identifikovať. QbD vyžaduje identifikáciu všetkých kritických atribútov formulácie a parametre procesu, rovnako ako určenie rozsahu, v akom akákoľvek zmena môže mať dopad na kvalitu finálneho produktu. Čím viac informácií je identifikovaných s významným alebo menej významným vplyvom jednotlivých zložiek, alebo procesov na konečnú kvalitu produktu, tým je zaručená vyššia bezpečnosť a účinnosť prístupu QbD.¹⁹

Variabilita pomocných látok sa stala problémom v posledných rokoch, najmä s prijatím QbD princípov pre návrh a vývoj farmaceutických hotových výrobkov. QbD vyžaduje zvýšené pochopenie kritických vlastností materiálov „Critical Material Attributes“ (CMAs) a kritických parametrov procesu „Critical Process Parameters“ (CPPs), ktoré majú potenciál ovplyvniť dôležité vlastnosti kvality „Critical Quality Attributes“ (CQAs) hotového výrobku.²⁰

Hodnotenie kvality, tak aby finálny produkt vyhovoval požadovaným parametrom (napr. po zmene dodávateľa substancie) nastavenie kritických parametrov, ktoré ovplyvňujú kvalitu a ktoré nie sú doteraz zadefinované v špecifikáciách. QbD je možným prínosom pre výrobcov pretože rutinné testovanie kontroly kvality môže detegovať výsledky mimo špecifikácie „Out of Specification“ (OOS). Pre výrobcov, ktorí nepracujú QbD prístupom a nemajú zadefinované CQAs, výsledok mimo špecifikácie prináša veľa otázok pre identifikovanie príčiny. Ak chýbajú dáta, ktoré by inak poskytlo QbD, je potrebné vykonať veľa testov, otázky majú ťažké odpovede a trvajú dlhší čas. Bez znalostí procesu je odhaľovanie a riešenie nevyhovujúcich výsledkov postupným skúšaním a testovaním časovo a finančne náročným postupom.²¹ Zvlášť pre generických výrobcov liekov je oneskorenie uvedenia lieku na trh, alebo schválenie registrácie finančnou stratou. Finančne náročné sú aj interné náklady na testovanie vhodných vstupných surovín, nepoužitie nevyhovujúcich šarží, ich vyšetrenie a nakoniec likvidácia produktu. Podobne veľké náklady stojí sťahovanie produktu z trhu a následne jeho návrat na trh, navyše pri riešení straty dôvery.²²

Je dôležité podotknúť, že právne predpisy, ktoré upravujú nakladanie s liečivami a liečivými prípravkami v rámci európskej legislatívy sú spracované v zbierke pravidiel a predpisov EudraLex, ktorého „Volume 4“ popisuje „Good manufacturing practice (GMP) Guidelines“, ktorého „Part I“ uvádza „Basic Requirements for Medicinal Products“.²³

2.2 REGULÁCIA

V prostredí GMP dokumentácia musí spĺňať určité požiadavky, aby sa zabezpečilo, že produkt je kvalitný a bezpečný. Ak inštrukcie na výrobu alebo hodnotenie kontroly kvality alebo záznamy o vykonávaných činnostiach sú nedostatočne zdokumentované, potom výroba, kontrola kvality produktu alebo zabezpečenie akosti môžu byť negatívne ovplyvnené a potenciálne sa znižuje bezpečnosť pacienta. V dôsledku toho štandardný systém dokumentácie v rámci farmaceutickej spoločnosti môže mať priamy vplyv na úroveň kvalitnej výroby produktov, ktoré sú takto v každom kroku pod dohľadom, rovnako má vplyv aj na úspech a dôveru na procesy v priebehu auditu, či už zo strany štátnej autority, alebo zákazníka.

Kapitolu 4 „Dokumentácia“ zo zbierky pravidiel a predpisov EudraLex je možno rozdeliť na základné dva typy: predpisovú a záznamovú, ktorých stručný prehľad uvádza Tabuľka 2.2.

Tabuľka 2.2 Stručný prehľad typov dokumentácie

Výhody	Popis	Typ dokumentácie
Uchováva históriu	Miesto pre uchovávanie rôznych typov dokumentácie pre každého s oprávneným prístupom. Informácie môžu byť pridávané kedykoľvek so zaznamenaním zmien. Zaznamenáva tlač a sťahovanie neplatných verzií dokumentu.	predpisová (špecifikácie, podklady k registrácii...)
Evidencia školení a vzdelávania	Poskytuje informácie o školeniach všetkých príslušných zamestnancov, aby bola zaistená kvalita a bezpečnosť produktu.	záznamová
Zmenové konania	Schvaľovanie, zdieľanie informácií o zmenách a archivácia zmien. Kontinuita aj pri odchode zamestnanca.	záznamová
Poskytuje platné dôkazy	Dokumentovanie udalostí, procesov, vykonaných činností a pod., ktoré môžu preukázať, že niečo bolo alebo nebolo vykonané	záznamová
Prehľad o kvalite a konzistencii procesov, aktivít a výroby		

Správna dokumentácia je zásadná v každom aspekte farmaceutického priemyslu. Či už ide o registráciu produktu, výrobu, inšpekcie či už interné alebo u dodávateľa, či zmluvného výrobcu, a v neposlednej miere pri kontrole kvality produktu, jeho skladovaní, distribúcii k pacientovi. Dokumentačný systém farmaceutickej firmy musí

byť štandardizovaným nástrojom na tvorbu, používanie a v neposlednom rade archiváciu dokumentácie predpisovej ako aj záznamovej. Musí to byť samozrejme validovaný systém. Z pohľadu riadenia dokumentácie je oddelenie zabezpečovania akosti „Quality Assurance“ (QA) zodpovedné pri štandardných operačných postupoch „Standard Operating Procedure“ (SOP) za schvaľovanie SOP, archiváciu historických dokumentov, originálov dokumentácie, správu celého dokumentačného systému, a pri tvorbe SOP ich pripomienkuje.

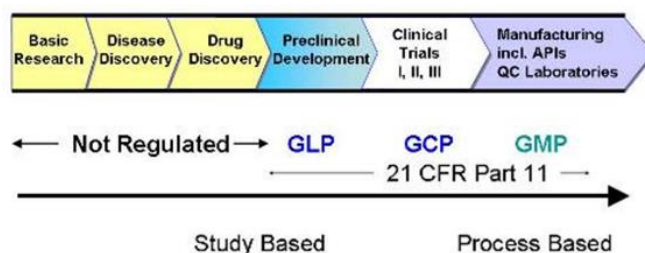
Časť z procesov je dôležitá pre registračné oddelenie, ktoré je zodpovedné za spravovanie registračnej dokumentácie, tvorbu podnikových noriem potrebných pre oddelenie kontroly kvality a tým aj na konečné vydanie certifikátu k vyrobenej šarži pred uvedením na trh. Je tu spravovaná časť zmenových konaní k prípravkom.

Samostatnou časťou je analytická dokumentácia na oddelení kontroly kvality. Jednoznačná identifikácia vzorky od jej vzorkovania, cez distribúciu do jednotlivých laboratórií, spracovanie vzorky, prevedenie analýzy metódami, ktoré sú validované, na zariadeniach, ktoré sú kvalifikované v pravidelných intervaloch so všetkou dokumentáciou, ktorá k tomu výkonu prislúcha. Ďalej je to vyhodnocovanie primárnych údajov a ich schvaľovanie, správa nameraných údajov a ich archivácia podľa hore uvedených požiadaviek.

Prvým z najdôležitejších krokov na kontrole kvality je vzorkovanie. Vzorka musí byť reprezentatívna, podľa počtu dodaných obalov sa vyberá štatisticky významný počet na hodnotenie. Skutočne náhodné vzorky je často ťažké alebo nemožné získať. cGMPs nevyžadujú skutočne náhodné vzorky, ale vyžadujú reprezentatívnu vzorku na základe racionálnych kritérií. Musí existovať zdokumentovaný postup pre spôsob, akým bola vzorka odoberaná. Ak sa vzorkovanie správne vykoná, označí a zdokumentuje, vzorky by potom mali spĺňať túto požiadavku. To znamená, že je dôležité mať dobre popísaný postup vzorkovania a distribúcie vzoriek ako aj preškolený personál.²⁴

Samotnému vzorkovaniu ako dôležitej činnosti sa venujú predpisy FDA, WHO aj európske v EudraLex — zväzku 4 Good manufacturing practice (GMP) Guidelines.

V laboratóriu, ktoré pracuje v režime GMP, používa validované metódy, analýzy prevádza školený personál pracujúci na kvalifikovaných zariadeniach, je kladený dôraz na požiadavku dohľadateľnosti. Táto dohľadateľnosť v každom kroku sa odvíja od kontrolovanej a kontrolovateľnej výroby. Rozdelenie laboratórií v rôznych fázach výskumu a vývoja podľa náročnosti na reguláciu ich chodu zobrazuje Obrázok 2.1.



Obrázok 2.1 Schéma začlenení laboratórií kontroly kvality súvisiacich s výrobou vzhľadom na dokumentáciu a riadenie ich činností²⁵

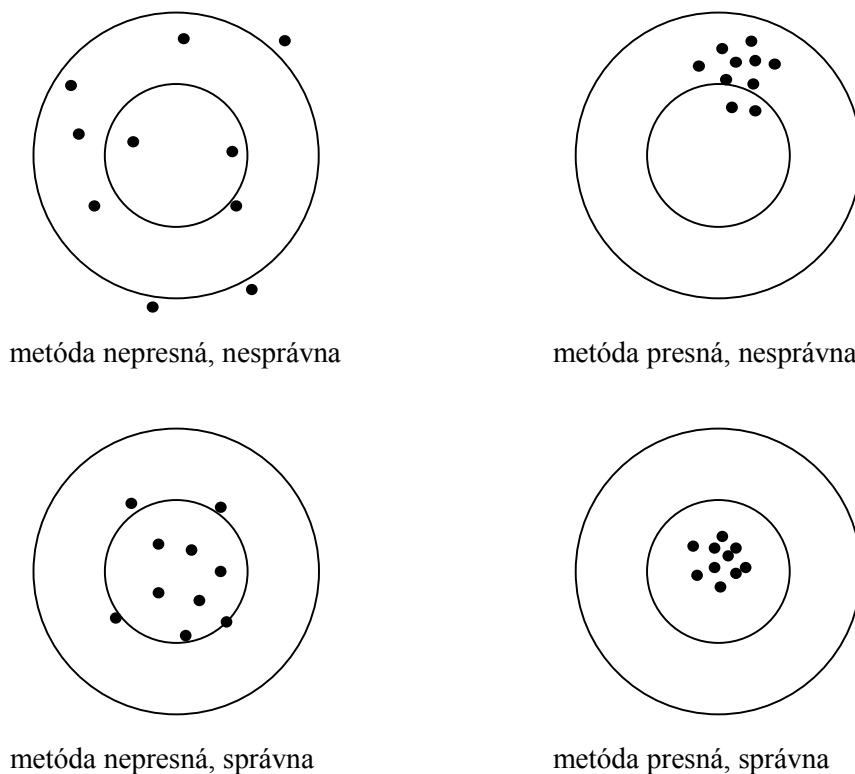
2.3 ANALYTICKÉ METÓDY

V súčasnej dobe je vo farmaceutickom priemysle k dispozícii pre analýzu látok okrem klasických metód taká veľká škála separačných metód, spektrálnych metód s možnosťou využitia širokého rozsahu elektromagnetického žiarenia až po analýzu pevnej fázy. Na analytické hodnotenie je kľúčový výber inštrumentov. Veľká väčšina kvantitatívnych analýz vo farmaceutickom priemysle je riešená výberom separačných metód s prevažným zastúpením vysokoúčinnou kvapalinovou chromatografiou. Okrem rutinne zabehnutých analytických metód sa pri riešení problémov rozširuje paleta hodnotenia aj na menej bežne používané techniky. Z hľadiska možnosti využitia v kontrolnej — analytickej činnosti je však nevyhnutné, aby všetky prístroje a metódy boli validované.

Analytické metódy historicky vychádzali od najjednoduchších metód hodnotenia kvality, ktoré nazývame klasickými metódami kam patria metódy titračné, gravimetrické, stanovenie obsahu vody, cez modernejšie metódy separačné, spektrometrické, až po metódy najmodernejšie ako sú metódy pevnej fázy termická analýza, röntgenová difrakcia, analýza veľkosti a tvaru častíc, analýza povrchu, zmáčavosti atď.

Metódy, ktoré sú aplikované na oddelení kontroly kvality musia byť validované. Cieľom validácie analytickej metódy je preukázať jej vhodnosť pre daný účel, t. j., že je presná a správna. Vzťah medzi presnosťou a správnosťou ilustruje Obrázok 2.2. Mierou presnosti je rozptyl jednotlivých hodnôt, vyjadrený ako relatívna smerodajná odchýlka (RSD).

Dôvodov prečo validovať analytické metódy je viacero, napr. je to povinná časť registračnej dokumentácie, chemické merania sú naviazané na certifikované referenčné materiály, validácie analytických metód sú základom validácie procesnej, výrobca má povinnosť poskytovať produkt bezpečný a účinný pre pacienta, výsledky v rôznych laboratóriách musia byť porovnateľné, validačné merania pomáhajú optimalizovať nové vyvíjané metódy.²⁶

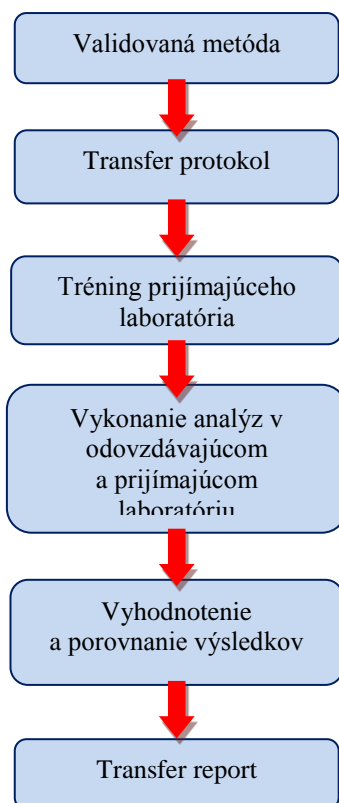


Obrázok 2.2 Vzťah medzi presnosťou a správnosťou²⁶

Validácie sú súčasťou SVP a preto musia byť náležite dokumentované a vykonávané iba na kvalifikovaných a kalibrovaných zariadeniach a prístrojoch.^{26,27} Pri každej zmene, ktorá môže ovplyvniť výsledky analytického hodnotenia, je potrebné znovu overiť vhodnosť metódy pre daný účel. Rozsah takejto revalidácie závisí od povahy zmien. Revalidácia sa vykonáva pri zmenách v zložení prípravku, výrobného postupu, analytickej metódy, legislatívnych požiadaviek.^{28,29}

Po zvalidovaní analytickej metódy, ktorá sa často vykonáva na pracovisku vývojových laboratórií je na jej zavedenie do rutinej kontroly kvality potrebné vykonať a zdokumentovať transfer analytickej metódy. Tento sa vykonáva aj pri prenose metódy medzi dvomi laboratóriami. Na jednej strane je odovzdávajúce laboratórium a na druhej laboratórium prijímajúce. V súčasnosti je transfer analytickej metódy jedným krokom zo životného cyklu analytickej metódy, predovšetkým vo farmaceutickom priemysle. Takisto aj túto časť upravujú smernice, avšak sú tu uvedené len všeobecné časti a nie sú tu upravené presné akceptačné kritériá a podmienky.²⁷ Transfer analytickej metódy je proces v niekoľkých krokoch, najskôr na základe výsledkov z validácie a praktických skúseností odovzdávajúce laboratórium pripraví protokol o transfere, v ktorom sú presne zadané rozsah analýz,

nastavené limity a akceptačné kritériá. Prehľadná postupnosť krokov transferu je zobrazená v nasledujúcej schéme:



Na začiatku transferu analytickej metódy je potrebné zdefinovať sledované parametre, akceptačné kritériá a ako výsledky štatisticky vyhodnotiť. Ako štatistické hodnotenie sa môžu použiť štatistické testy významnosti, rovnocennosti, alebo rozdielnosti. Najčastejšie sa volí prístup jednoduchého porovnávania, kedy musí platiť, že chyba prenosu musí byť porovnateľná s chybou metódy — variabilitou analytického procesu s_{\max} .³⁰ Akceptačné kritériá sa volia pre opakovateľnosť, reprodukovateľnosť, rozdiely medzi laboratóriami, rozdiel medzi jednotlivými priemerami ďalej je to linearita metódy, detekčné a kvantifikačné limity. Zohľadňuje sa typ procesu napríklad ak sa jedná o obsah API, kde je obsah ovplyvnený iba obsahom nečistôt, na rozdiel od porovnávania obsahu pre finálny produkt.³⁰

Vzhľadom na možnosť použitia širokej palety rôznych metód a metódik používaných oddelením kontroly kvality (QC) k hodnoteniu vstupných surovín, medziproduktov a finálnych produktov sa v nasledujúcich kapitolách budem venovať iba metódam, ktoré som použila vo svojej práci, resp. patria medzi najzákladnejšie metódy.

2.3.1 Stanovenie obsahu vody

Jedným zo základných parametrov hodnotenia kvality vstupných surovín a účinných látok s dopadom na celkovú kvalitu a stabilitu finálneho farmaceutického prípravku ako aj jeho výrobu je stanovenie obsahu vody.

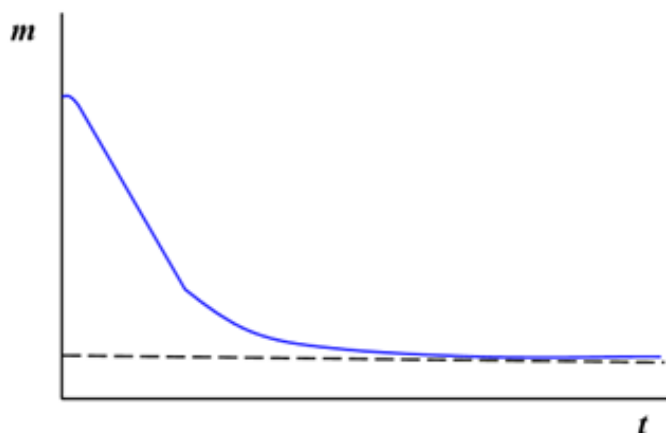
Pre stanovenie vody bolo navrhnutých veľa fyzikálnych, fyzikálno-chemických a chemických metód. Najčastejšie používané sú nasledovné metódy: gravimetrické stanovenie vody, titračné stanovenie vody podľa K. Fischera, titračné stanovenie coulometrickou metódou. Tieto metódy budú popísané nižšie. Stanovenie vody je možné aj ďalšími metódami ako sú destilačné stanovenie vody, refraktometrické stanovenie sušiny, plynová chromatografia, spektrometria v blízkej infračervenej oblasti (NIR), NMR spektrometria, dielektrimetria.³¹

2.3.1.1 Gravimetrické stanovenie vody

Jednou z najčastejšie používaných metód je gravimetrické stanovenie sušiny (strata sušením). Sušina je hmota vzorky po odstránení vody sušením. Obsah vody sa stanovuje z hmotnostného úbytku po vysušení vzorky. Pre stanovenie zvyčajne stačí základné vybavenie laboratória. Je to metóda vhodná pre analýzu vzoriek s malým a stredným obsahom vody, vo väčšine prípadov je náročná na čas, ktorý závisí od obsahu vody a interakciách vody so vzorkou (voda voľná, voda viazaná v kryštalickej štruktúre).

Bežným spôsobom je sušenie pri 105 °C do konštantnej hmotnosti alebo do konštantného úbytku hmotnosti (zvyčajne 5 hodín). Obrázok 2.3 popisuje priebeh zmeny hmotnosti v závislosti na čase. Ďalšími spôsobmi sušenia sú sušenie pri zníženom tlaku vo vákuovej sušiarňi pri 98 — 100 °C (1 hodina), rýchle sušenie pri 155 °C, 15 minút, sušenie mikrovlnným ohrevom (veľmi rýchla metóda) a sušenie v exikátore nad P₂O₅ alebo bezvodým Mg(ClO₄)₂.³¹

Najčastejšie chyby, ktoré môžu ovplyvniť stanovenie sú javy, ktoré vedú k strate prchavých látok ako sú zbytkové rozpúšťadlá, silice a iné, čiastočnej dehydratácii niektorých materiálov za zvýšených teplôt (karamelizácia cukrov), alebo oxidácia lipidov (zvýšenie hmotnosti).



Obrázok 2.3 Priebek zmeny hmotnosti v závislosti na čase³¹

2.3.1.2 *Titračné stanovenie vody metódou podľa K. Fischera*

Metóda je pomenovaná po nemeckom chemikovi Karlovi Fischerovi, ktorý v roku 1935 zaviedol jodometrické stanovenie vody.

Voda sa extrahuje zo vzorky bezvodým metanolom (alebo etanolom). Extrakt sa titruje Fischerovým činidlom ($\text{SO}_2 + \text{I}_2 + \text{CH}_3\text{OH} + \text{pyridín}$). Zložky činidla za prítomnosti vody reagujú navzájom a prebieha oxidačno-redukčná reakcia. Bod ekvivalencie sa indikuje biampérometricky, pričom prechodom prúdu elektrochemickou nádobkou sa na platinovej elektróde vytvára z prítomného jodidu elementárny jód, ktorý je titračným činidlom. Jeho množstvo je priamo úmerné prejdenému náboju.

Metóda má vysokú presnosť a správnosť, radí sa medzi absolútne metódy. Stanovenie je rýchle, ale používajú sa toxické chemikálie. Metóda je vhodná pre vzorky s nízkym obsahom vody.³¹

2.3.1.3 *Titračné stanovenie vody coulometrickou metódou*

Aplikáciou mikroprocesorov a využitie coulometrie vytvorilo možnosť plne automatizovaného prístroja. Prechodom prúdu cez elektrochemickú nádobku sa na platinovej anóde vytvára z prítomného jodidu elementárny jód, ktorý je titračným činidlom. Jeho množstvo je priamo úmerné prejdenému náboju — integrálu prúdu v čase. Jednotkou náboja je coulomb, ktorý sa vytvorí prúdom jedného ampéra za čas jednej sekundy. Z Faradayovho zákona elektrolýzy je potom možné vyjadriť látkové množstvo analyzovanej zlúčeniny, v tomto prípade vody. Pre stanovenie vody sa používa najčastejšie jednoúčelový titrátor. Jód, ktorý vzniká v nádobke pri prechode prúdu reaguje s ekvivalentným množstvom vody, ak už všetka voda v nádobke zreagovala, je zaznamenaná narastajúca koncentrácia.

Koncentrácia jódu je detegovaná biapérometricky dvojicou platinových elektród. Po nástreku vzorky sa náhle mení signál indikačného obvodu a mikroprocesor vyhodnotí zmenu a zahájí automatický štart merania. Meranie je ukončené pri dosiahnutí pôvodnej hodnoty indikačného prúdu pred nástrekom vzorky. Výsledkom merania je stanovené celkové množstvo vody v mikrogramoch. Prepočet na koncentráciu vody v ppm (parts per million) je možný po zadaní hmotnosti vzorky. Výsledok môže byť vyjadrený tiež v percentách (1 % zodpovedá 10 000 ppm).³²

2.3.2 Spektrálne metódy

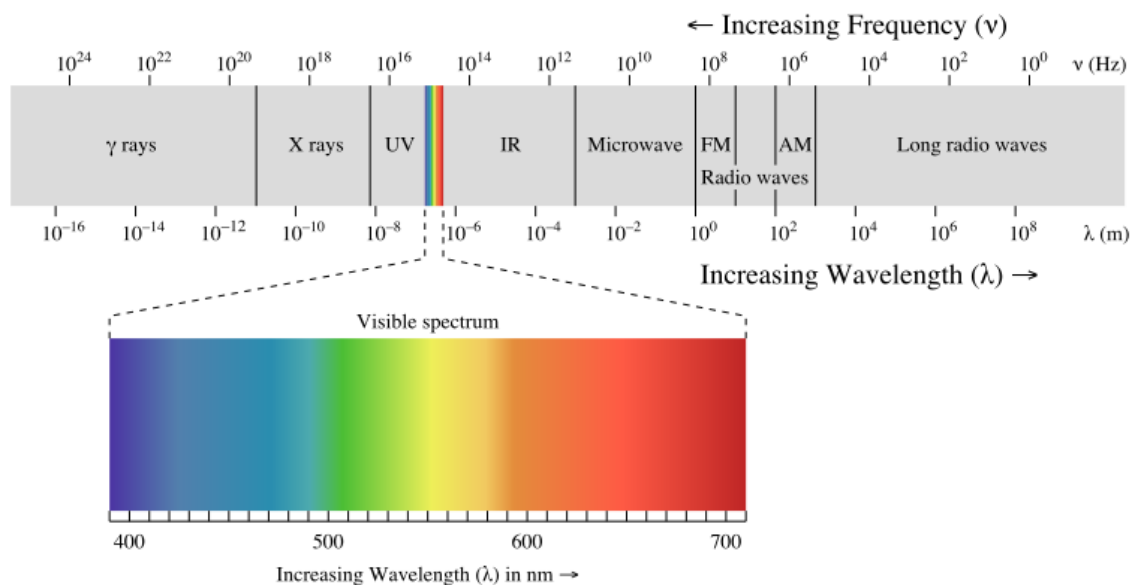
Pojmom spektrálne metódy označujeme súbor inštrumentálnych metód, ktoré majú spoločný princíp interakcie hmoty so žiarením. Tieto metódy využívajú absorpciu alebo emisiu žiarenia, napr. spektrofotometria v ultrafialovej a viditeľnej oblasti (UV–VIS), infračervená spektrometria (IČ), Ramanova spektrometria, fluorescenčná alebo atómová emisná spektrometria. Zobrazenie rozloženia jednotlivých metód vzhľadom k vlnovým dĺžkam dokumentuje Obrázok 2.4.

Absorpčná spektrometria využíva absorpciu svetla roztokmi stanovovaných látok. Analytické optické metódy v závislosti od oblasti absorpcie a využitej inštrumentálnej techniky delíme na spektrometriu vo viditeľnej a ultrafialovej oblasti (ďalej UV–VIS spektrometria), infračervenej oblasti (ďalej IR spektrometria), ktorej samostatne využívanou časťou je blízka oblasť (ďalej NIR spektrometria).

UV–VIS spektrofotometria je pre svoju nenáročnosť a inštrumentálnu jednoduchosť a rýchlosť vykonania analýz využívaná v širokom rozsahu predovšetkým ku kvantitatívnym, ale aj kvalitatívnym analýzám v kontrolných a aj vývojových laboratóriách.

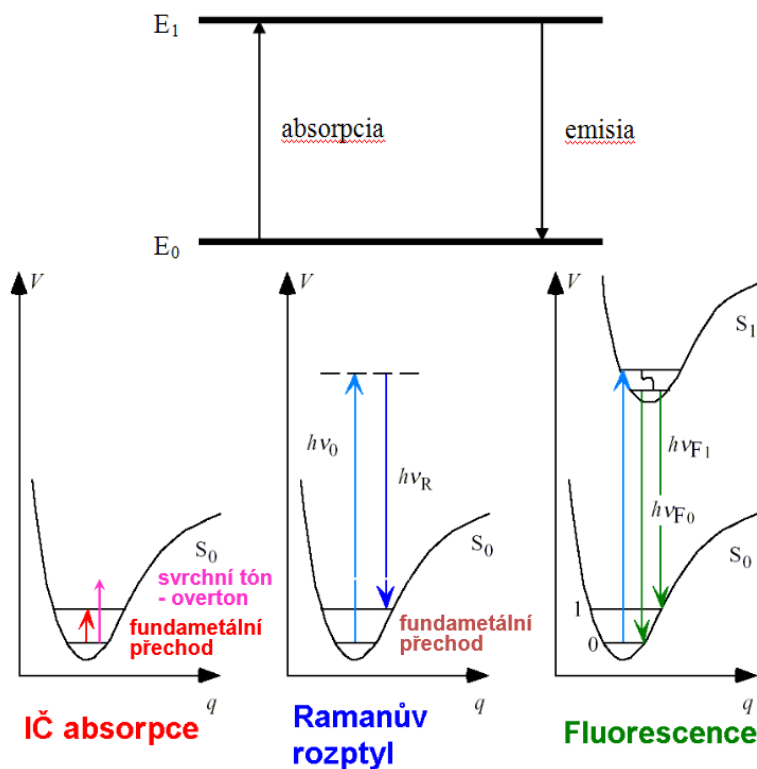
IČ spektrometria nachádza stále väčšie uplatnenie vo farmaceutickom priemysle v oblasti rutínnej kontroly kvality rovnako ako aj vo vývojových laboratóriách. Prednosťou je predovšetkým rýchlosť merania, jednoduchá príprava vzorky (niekedy aj priame meranie vzorky bez úpravy). Pri bežných meraniach zariadenie môže obsluhovať personál bez hlbokých znalostí princípov metódy, čo umožňuje úsporu z pohľadu nárokov na obsluhu.

Bez znalostí základných princípov sa však nedá obísť pri zložitejších aplikáciách (napr. nastavenie merania v komplexnej matici liekovej formy), vyhodnocovanie spektier neznámych látok, alebo určovanie štruktúry.²⁶



Obrázok 2.4 Spektrálny rozsah elektromagnetického žiarenia a znázornenie významných oblastí³³

Pre všetky spektrálne techniky sú základom výmeny energetického kvanta pri interakcii skúmanej látky a elektromagnetického žiarenia. Sleduje sa množstvo pohltenej energie pri excitácii zo základného energetického stavu atómu alebo molekuly (absorpčná spektrometria) alebo množstvo vyžiarenia energie pri návrate atómu alebo molekuly z excitovaného stavu (emisná alebo fluorescenčná spektrometria), vid' Obrázok 2.5.



Obrázok 2.5 Schéma energetického prechodu molekuly/atómu zo základného stavu do excitovaného stavu pri absorpcii a naopak pri emisii³⁴

Elektromagnetické žiarenie je charakterizované energiou žiarenia E , rýchlosťou c , vlnovou dĺžkou λ , frekvenciou žiarenia ν a pre ich vzájomný vzťah platí:

$$\Delta E = h \cdot \nu = h \frac{c}{\lambda}$$

ΔE – energia (spotrebovaná/uvoľnená) pri zmene energetického stavu častice,

h – Planckova konštanta,

ν – frekvencia žiarenia,

c – rýchlosť svetla,

λ – vlnová dĺžka žiarenia.

Energetický prechod je charakterizovaný vlnovou dĺžkou (alebo frekvenciou, prípadne vlnočtom) absorbovaného/emitovaného žiarenia. Krátke vlnové dĺžky zodpovedajú vysoko energetickým elektrónovým prechodom (stovky nm) naopak dlhé vlny sú špecifické napr. u mikrovlnného žiarenia pre rotačné prechody (jednotky cm). Energia prechodov sa z praktických a historických dôvodov vyjadruje vo viacerých jednotkách napr. eV, J, nm, cm^{-1} , GHz, atď.

Ak definované množstvo žiarenia prechádza homogénnym prostredím, zoslabuje sa jeho počiatočná intenzita o množstvo, ktoré je týmto prostredím absorbované. Absorpciou sa znižuje intenzita žiarenia, ale jeho vlnová dĺžka sa nemení. Pri prechode svetelného lúča s intenzitou I_0 cez vrstvu prostredia, ktoré absorbuje, hrúbky l časť sa absorbuje a časť s intenzitou I vychádza. Platia nasledujúce vzťahy:

$$A = \log \frac{I_0}{I}$$

$$T = \frac{I}{I_0}$$

T – transmitancia

$100 \cdot T$ – priepustnosť [%]

A – absorbancia

Lambert-Beerov zákon:

$$A = \varepsilon \cdot c \cdot l$$

ε – molárny absorpčný koeficient [$\text{l/mol}\cdot\text{cm}$]

c – molárna koncentrácia [mol/l]

l – hrúbka vrstvy [cm]

Z Lambert-Beerova zákona vidieť, že absorbancia je lineárnou funkciou koncentrácie. Vynesením závislosti $A = f(c)$ pri konštantnej vlnovej dĺžke λ získame kalibračnú krivku. Lambert-Beerov zákon platí iba pre monochromatické svetlo a do určitej koncentrácie analytu v roztoku. Za prítomnosti viacerých zložiek je výsledná absorbancia daná súčtom absorbancií jednotlivých zložiek.³⁵

Výraz $A_{1cm}^{1\%}$ je špecifická absorbancia. Je to liekopisná veličina, ktorá vyjadruje absorbanciu roztoku látky o koncentrácii 10 g/l meranú v 1 cm vrstve pri určitej vlnovej dĺžke.

$$A_{1cm}^{1\%} = \frac{10\varepsilon}{M_r} = \frac{A}{c' \cdot l'}$$

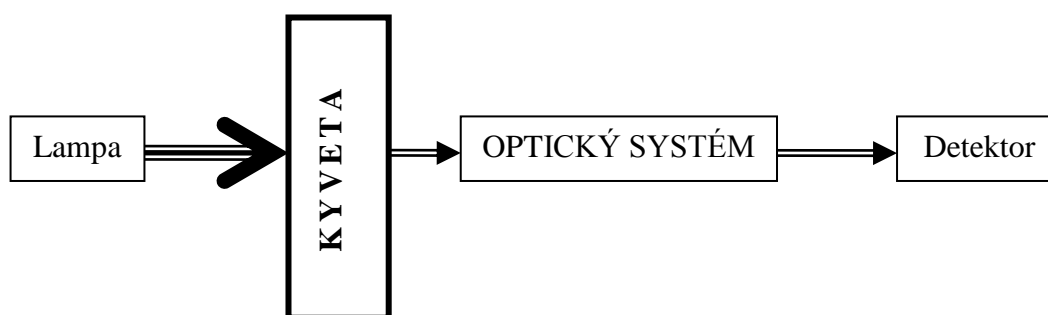
A – absorbancia pri 20 ± 1 °C

c' – koncentrácia [10 g/l]

l' – hrúbka vrstvy 1 cm

2.3.3 UV-VIS spektrofotometria

Energia prechodov v UV a VIS oblasti zodpovedá cca 200 — 800 nm. (V UV–VIS spektrofotometrii sa preferuje jednotka nanometer [nm].³⁵) Absorpčné spektrá látok v roztoku majú charakter pásov (nevýrazných pík). Absorpcia svetla roztokmi látok sa využíva predovšetkým v kvantitatívnej analýze. Schému spektrofotometra uvádza Obrázok 2.6.



Obrázok 2.6 Schéma zariadenia

Zdroje žiarenia sú lampy pre oblasť 350 — 3000 nm wolfrámová lampa, pre oblasť 60 — 375 nm deutériová lampa. Kyvety podľa meranej oblasti sa používajú sklenené vo viditeľnej oblasti nad 350 nm, v UV a VIS oblasti kremenné. Optický systém pozostáva z farebných filtrov (fotometria), monochromátorov (spektrofotometria). Detektorom býva fotonásobič, diodové pole, CCD (Charge-Coupled Device, čiže zariadenie s viazanými nábojmi; jedná sa o obrazový senzor, teda zariadenie citlivé na svetlo generujúce obraz).

Vplyv na meranie má takisto výber rozpúšťadla, riedenie vzorky v optimálnom rozsahu absorpcie 0,1 — 1,5; záznam spektra, t.j. rýchlosť skenu, spektrálny interval užší (0,2 — 0,5 nm) dáva vysoké rozlíšenie, ale horšiu opakovateľnosť, naopak širší (1,5 — 4 nm) poskytuje malé rozlíšenie ale lepšiu opakovateľnosť merania.²⁶

2.3.4 IR spektrometria

Táto technika je metódou prvej voľby pre rýchle a spoľahlivé analýzy vo farmaceutickom priemysle, je uznávanou aj štátnymi autoritami a je uvedená aj v Európskom liekopise alebo FDA smerniciach. IČ spektrometria sa využíva v rutinnom prostredí kontrolného laboratória predovšetkým na kvalitatívnu analýzu vzoriek v kvapalnom (nevodnom) ale aj pevnom skupenstve.

Využíva sa infračervené žiarenie s vlnovými dĺžkami $\lambda = 0,78 — 1000 \mu\text{m}$. Oveľa častejšie sa používajú v IČ spektrometrii ako jednotky vlnočty a IČ žiarenie je vymedzené oblasťou $\nu = 12800 — 5 \text{ cm}^{-1}$. Toto žiarenie má nižšiu energiu ako UV–VIS žiarenie a jeho energia nestačí k zmene elektrónového stavu molekuly, ale iba k zmene vibračných a rotačných stavov molekuly. Vzhľadom na široké energetické rozmedzie je oblasť IČ rozdelená na tri časti:

1. blízka oblasť — Near-Infrared, NIR 12800 — 4000 cm^{-1} je to oblasť s najvyššou energiou, kde molekuly môžu vibračne excitovať aj do vyšších vzbuđených stavov ako je prvý, t.j. do druhého, tretieho a ďalších — nazývajú sa vrchné tóny alebo overtóny. Význam využitia tejto oblasti je predovšetkým pre kvalitatívnu a kvantitatívnu analýzu.
2. stredná oblasť — Mid-Infrared, MIR 4000 — 200 cm^{-1} je to oblasť fundamentálnych vibrácií, t.j. vibračných prechodov zo základného do prvého vzbuđeného vibračného stavu. Táto oblasť je najdôležitejšia z pohľadu analytických aplikácií pre štruktúrnu diagnostiku, charakterizáciu a identifikáciu organických látok.
3. vzdialená oblasť — Far-Infrared, FIR 200 — 5 cm^{-1} je to oblasť s najnižšou energiou a teda zmeny nastávajú predovšetkým v rotačných spektrách). Význam klasickej FIR je predovšetkým pre teoretickú chémiu a molekulovú fyziku.³⁵

V súčasnosti sa ale začína čoraz viac aj vo farmaceutickej analýze využívať tzv. Terahertzová (THz) spektroskopia, ležiaca v pásme hraničiacom so vzdialenou oblasťou IR na jednej strane a mikrovlnnou (elektronickou) oblasťou na druhej strane, teda je možné jej približné vymedzenie frekvenciami 100 GHz až 3 THz, čo zodpovedá vlnovým

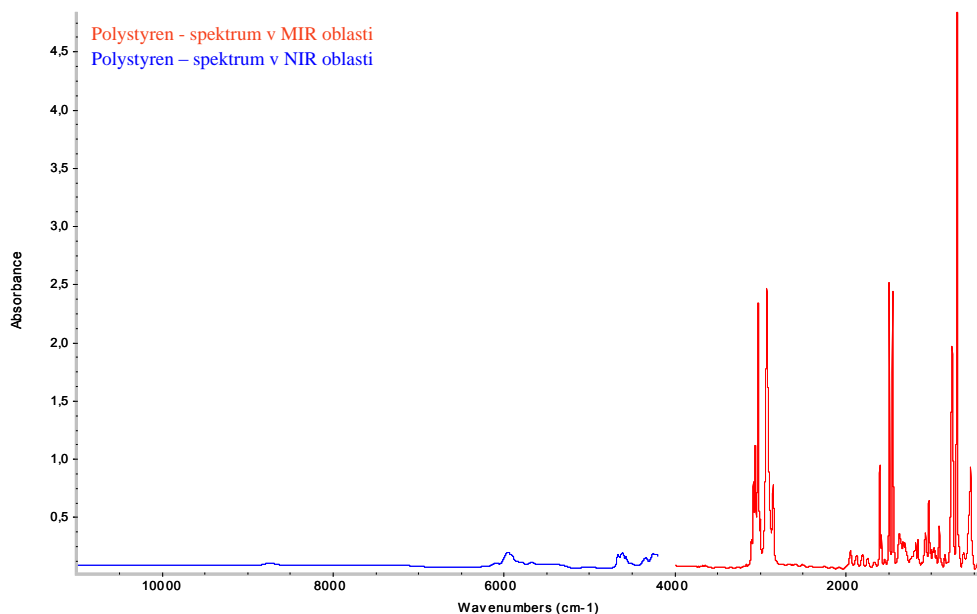
dĺžkam 3 až 0,1 mm resp. vlnótu 3 až 100 cm^{-1} . Využitie terahertzov je možné rozdeliť do troch hlavných kategórii: spektroskopia, zobrazovacie metódy a telekomunikácie. Aplikácie THz spektroskopie sa uplatňujú vo farmaceutickom priemysle predovšetkým v analýze/charakterizácii API, pomocných látok a obalového materiálu, resp. zmesných vzoriek API a excipientov. Vo väčšine prípadov sa však zatiaľ jedná o pilotné štúdie, ktorých cieľom je preukázať vhodnosť určitej metódy pre daný špecifický účel. Je možné očakávať prudký rozvoj a nástup tejto metódy vo farmácii v najbližších rokoch.^{36,37}

Pre interpretáciu IR spektier sú dôležité predovšetkým zmeny vibračných stavov. Rozlišujeme valenčné vibrácie, kedy sa mení dĺžka väzby a deformačné vibrácie, kedy sa mení uhol väzby. V IR spektre rozlišujeme oblasť charakteristických vibrácií a oblasť „odtlačku palca“, ktorá je daná celkovou štruktúrou molekuly. Pre všetky aplikácie kvalitatívne ako aj kvantitatívne je potrebné zmerať štandard alebo sériu štandardov, pretože meraním bez štandardov je možné iba zhodnotiť či merané vzorky vykazujú odlišnosti.

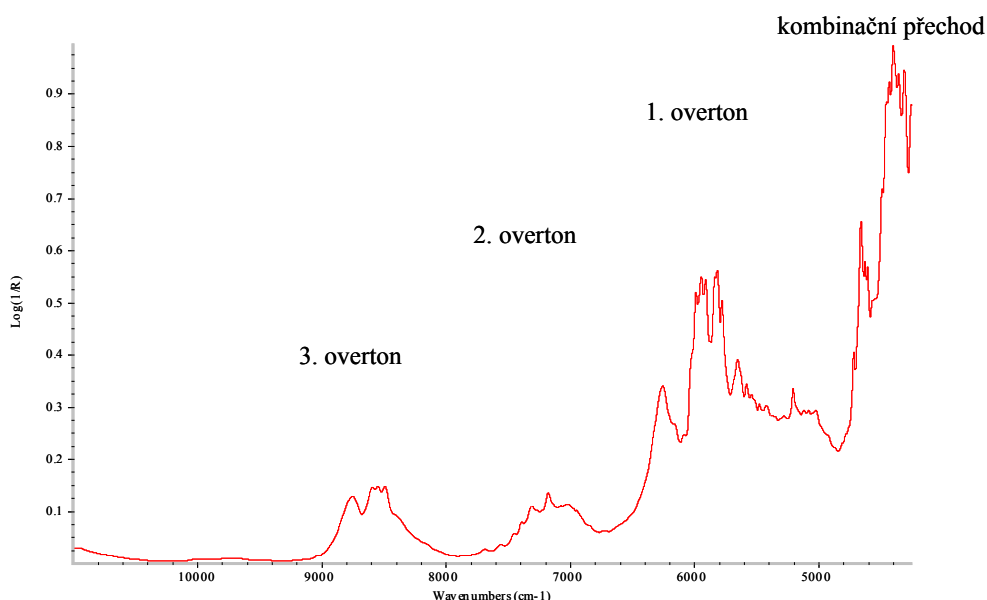
Využitie merania v strednej oblasti MIR je v praxi bežne rozšírené. V tejto práci sa však prednostne venujem použitej NIR.

Nakoľko absorpcia žiarenia v NIR oblasti je vo väčšine prípadov vyvolaná energetickými prechodmi medzi vibračnými hladinami molekúl a to prechodmi kombinačnými (súčasná excitácia niekoľkých vibračných módo) a overtónov. Overtón zodpovedá excitácii vibračného módu do vyššej excitovanej hladiny. Fundamentálne prechody sú dominantné pre strednú oblasť IR a z tohto dôvodu sú NIR spektrá jednoduchšie ako MIR spektrá. Absorpcia žiarenia v NIR oblasti je pri rovnakej hrúbke vzorky rádovo nižšia ako v MIR oblasti, čo znázorňuje Obrázok 2.6.³⁸ A na identifikovanie vzorky len na základe NIR spektra, je potrebný štandard na porovnanie. Je to metóda rýchla a nedeštruktívna.

V NIR oblasti sa neprevádza rozbor a priradovanie absorpčných pásov k jednotlivým kombinačným prechodom a overtónom nakoľko je to veľmi zložitý niekedy až nemožný. V NIR spektrách je však možné vymedziť oblasti, v ktorých sú dominantné pásy kombinačných prechodov ($4000 - 5300 \text{ cm}^{-1}$), prvé overtóny ($4600 - 7300 \text{ cm}^{-1}$), druhé overtóny ($6000 - 10000 \text{ cm}^{-1}$) a tretie overtóny ($8800 - 12800 \text{ cm}^{-1}$). Rozloženie absorpčných pásov v NIR oblasti zobrazuje Obrázok 2.7.



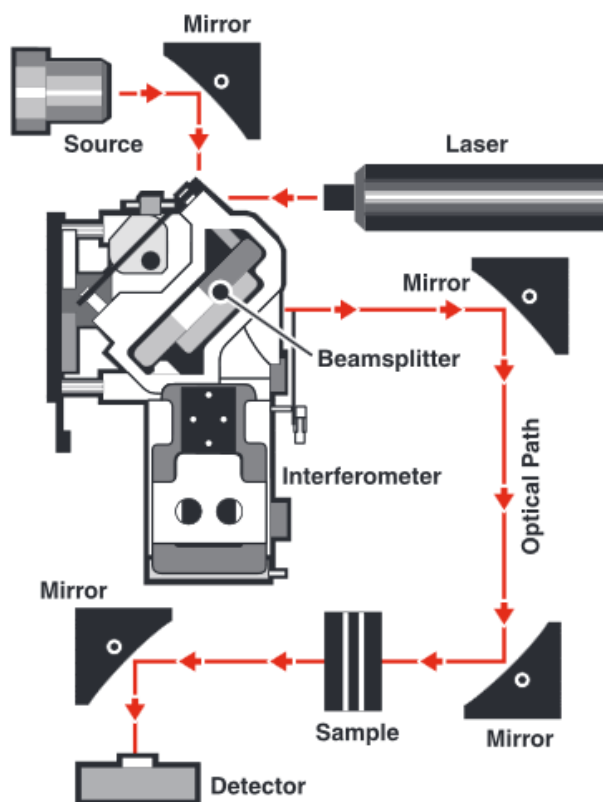
Obrázok 2.6 Porovnanie intenzity absorpčných pásov v NIR a MIR oblasti³⁸



Obrázok 2.7 Ukážka NIR spektra — kombinačný prechod a overtóny³⁸

Všetky NIR spektrometre sa skladajú z troch základných častí a to zo zdroja žiarenia, detektora, a interferometra. Zdrojom žiarenia sú halogénové žiarovky, na detekciu sa používajú rôzne InGaAs, PbSe, PbS, Si detektory. Delič lúčov (beamsplitter) je vyrobený z kremeňa alebo CaF_2 , čo sú oveľa odolnejšie materiály a tiež menej náchylné na vplyv vzdušnej vlhkosti ako KBr alebo CsI, ktoré sú používané v strednej oblasti. Usporiadanie spektrometra zobrazuje Obrázok 2.8.³⁹ Blízke IR žiarenie bez problémov prechádza kremenným sklom a preto je optika z kremenných vlákien a aj kyvety môžu byť použité z rovnakého kremenného skla ako pre UV-VIS spektrofotometriu. Najväčšou výhodou

využitia NIR spektrometrie je možnosť merania vzoriek cez transparentné obaly. Je nedeštruktívne a nevyžaduje žiadnu špeciálnu úpravu vzorky a samotné meranie je rýchle — podľa nastavených parametrov merania od niekoľkých sekúnd po desiatky sekúnd. V NIR spektrách molekuly vody absorbujú IR žiarenie a pre elimináciu vplyvu okolia, hlavne vzdušnej vlhkosti je potrebné pred analýzou vzorky zmerať spektrum pozadia (background).



Obrázok 2.8 Usporiadanie spektrometra³⁹

Vo farmaceutickom priemysle sa na analýzu najčastejšie používa princíp difúznej reflexie nazývaný DRIFT, kde sa dopadajúce žiarenie odráža od povrchu malých častíc práškovitej vzorky.³⁸ Kvapalné vzorky sa merajú v kyvetách z kremenného skla, ktoré má priepustnosť v celej oblasti NIR. Hrúbka optickej vrstvy sa volí v závislosti od koncentrácie analytu vo vzorke a od optických vlastností rozpúšťadla. Tento typ merania sa nazýva transmisné meranie a je využívané pre meranie kvapalín, polymérnych fólií a kašovitých vzoriek. Kombináciou oboch spôsobov merania je technika nazývaná transflektancia, ktorá má svoje využitie pre meranie riedkych suspenzií, kvapalín alebo roztokov. Táto technika využíva špeciálne kyvety, ktorých dno je pokryté úplne odrážavou vrstvou (zrkadlom), ktorá žiarenie prejdené vzorkou odráža späť tak, že znovu prechádza vzorkou a dopadá na detektor.³⁸ Okrem

uvedených techník kedy je vzorka vkladaná do vzorkovacieho priestoru prístroja sa NIR spektrá merajú pomocou vláknovej optiky s rôznymi typmi sond, ktoré dokumentuje Obrázok 2.9.



Obrázok 2.9 NIR zariadenie a sonda z optických vlákien

V posledných rokoch, vibračné spektroskopické inštrumenty, ako je Raman alebo NIR, v spojení s kalibračnými postupmi s viacerými premennými majú stále narastajúci trend využitia vo farmaceutickom priemysle.^{40,41,42,43,44,45,46} Tieto analyzátory ponúkajú niekoľko výhod oproti klasickým „mokrým“ chemickým technikám. Jedná sa hlavne o neinvazívnu techniku s malou alebo žiadnou prípravou vzorky a rýchle meranie. Navyše Raman a NIR senzory poskytujú dôležité informácie o kvalite v priebehu rôznych fáz výroby API a lieku, a sú bežne používané pri vážení surovín, chemických reakciách (väčšinou Raman), granulácii, sušení (väčšinou NIR) a homogenizovaní. Môžu byť taktiež použité ako nedeštruktívne techniky overenia kvality (môžu tak byť s výhodou používané v procesnej analytickej technológii), najmä pre detekciu/kvantifikáciu polymorfov, účinnosti homogenizácie obsahu tabliet/kapsúl, testu obsahovej rovnorodosti.⁴⁷

Schopnosti NIR a Raman spektroskopie ponúkajú širokú škálu možností, ako uľahčiť reálny čas merania kritických atribútov kvality a umožňujú priebežné overovanie kvality v reálnom čase.⁴⁷ Namerané spektrá môžu byť použité pre kvalitatívnu ako aj kvantitatívnu analýzu. Spracovanie dát sa odvíja od spôsobu ich použitia. Spektrá získané pre kvalitatívne hodnotenie je potrebné porovnávať so spektrami štandardu, tento prístup je vhodný pre malé počty vzoriek. Veľké súbory spektier je vhodnejšie vyhodnocovať použitím chemometrickým štatistickým spracovaním údajov.

Štatistické hodnotenie kvalitatívnych a kvantitatívnych dát je možné viacerými metódami vyhodnotenia. Najvšeobecnejšie delenie štatistických metód je delenie na štatistickú analýzu jednorozmerných dát, štatistickú analýzu viacrozmerných dát a analýzu rozptylu.⁴⁸

Metóda analýzy hlavných komponentov „Principal Components Analysis“ (PCA). Je to klasická metóda pre vyhodnocovanie zhodnosti alebo odlišnosti chemických spektier. PCA metóda je zo skupiny viacrozmernej analýzy štatistických údajov. Umožňuje identifikovať vzorce v údajoch a vyjadriť dáta tak, aby boli zvýraznené ich zhody alebo odlišnosti. A ďalšou výhodou je schopnosť tieto dáta komprimovať bez straty počtu rozmerov a významnej straty informácií.⁴⁹ Je to vhodná metóda pre analýzu dát ako sú NIR spektrá. Táto metóda používa pre výpočet výsledkov vysokú maticovú algebru, variačnú a kovariačnú matematiku a ďalšie štatistické nástroje. Tieto však pre zložitý matematický aparát nebudú v práci diskutované.

Najčastejšie používané vyhodnocovacie metódy spektroskopie sú derivácia, de-trending a chemometrické štatistické metódy ako napr. Standard Normal Variate (SNV),⁵⁰ Multiplicative Scatter Correction (MSC)⁵⁰, Extended Multiplicative Signal Correction (EMSC), Orthogonal Signal Correction (OSC) a Generalize Least Squares (GLS).^{51,52,53,54} Pri analýze spektrálnych dát, je bežné vyskúšať rôzne vyhodnotenia a ich kombinácie, a posúdiť, ktoré vyhodnotenie je lepšie vzhľadom na požadované parametre. Avšak techniky vyhodnotenia by mali byť používané s opatrnosťou, pretože môžu pomôcť minimalizovať nežiaduce vplyvy, ale môžu tiež znížiť odozvu signálu sledovaného analytu. Preto predchádzajúce znalosti vyhodnotenia a interpretácie výsledkov vzoriek sú žiaduce, než náhodné výbery vyhodnocovacích metód.⁵⁵

Derivácia patrí medzi najčastejšie vyhodnocovacie metódy spektrálnych dát. Používa sa predovšetkým k zvýšeniu rozlíšenia a odstránenie konštantného vplyvu základnej línie medzi vzorkami. Prvá a druhá derivácia sú častejšie používané v praxi, ako tie vyššieho rádu. Spektrálna derivácia počíta získané rozdiely medzi dvoma po sebe nasledujúcimi bodmi, alebo vyhladzovaním/diferenciáciou špecifikovanej vzdialenosti; alebo použitím Savitzky-Golay polynómickej funkcie.⁵⁶ Niektoré bežné nevýhody aplikovania derivácie sú zvýšenie šumu a ťažšia interpretácia spektier.

Korekcia baseline (De-trending): Korekcia základnej línie je vykonávaná prostredníctvom odpočítania lineárnej alebo polynomiálnej funkcie základnej čiary, s cieľom odstrániť od pôvodného spektra variácie posunu základnej línie zvyčajne sa vyskytujúcich v NIR reflektančných spektrách práškových vzoriek a Ramanovho spektra s fluorescenciou pozadia.⁵⁵

Viacnásobná bodová korekcia (Multiplicative Scatter Correction, MSC): Korekcia MSC je dosiahnutá regresiou nameraného spektra voči referenčnému spektru a následnou korekciou nameraného spektra pomocou sklonu a priesečníkov tohto lineárneho uloženia.⁵⁷

Táto vyhodnocovacia metóda sa ukázala byť účinná pri minimalizácii odchýliek pri vyrovnávaní/korekcii základnej línie. Výsledok MSC, v mnohých prípadoch, je veľmi podobný SNV. Avšak mnohí spektroskopisti preferujú SNV pred MSC, pretože SNV opravuje každé spektrum individuálne a nepotrebuje celú sadu dát. Porovnanie týchto dvoch metód je podrobne opísaná Martensom a Starkom.⁵⁸

2.3.5 Fluorescenčná spektrometria

Fluorescenčná spektrometria je metóda, ktorá sa používa na meranie intenzity fluorescenčného svetla, emitovaného skúšanou látkou v porovnaní s emisiou roztokov so známym obsahom referenčnej látky.

Skúšaná látka sa rozpúšťa v rozpúšťadle alebo v zmesi rozpúšťadiel. Roztok sa preniesie do kyvety alebo fluorimetrickej trubice a osvetlí sa monochromatickým excitačným svetlom predpísanej vlnovej dĺžky. Meria sa intenzita fluorescenčného žiarenia v 90° uhle k vyžarovanému svetelnému zväzku po prechode cez filter, ktorý zachytí excitačné svetlo a prepúšťa len fluorescenčné žiarenie. Koncentrácia c_x skúšaného roztoku sa vypočíta podľa vzorca:

$$c_x = \frac{I_x c_e}{I_e}$$

c_x – koncentrácia skúšaného roztoku,

c_e – koncentrácia referenčného roztoku,

I_x – intenzita svetla emitovaného skúšaným roztokom,

I_e – intenzita svetla emitovaného referenčným roztokom.

Ak nie je intenzita fluorescencie priamo úmerná koncentrácii, na meranie je vhodnejšie použiť kalibračnú krivku. V niektorých prípadoch sa môže merať oproti inej referenčnej látke (napríklad fluorescenčnému sklu alebo roztoku inej fluorescenčnej látky). Koncentrácia skúšanej látky sa v takom prípade odčíta z kalibračnej krivky zostrojenej za rovnakých podmienok.⁵⁹

2.3.6 Chromatografia

Na oddelenie analyzovaných zložiek zo zmesi látok a k ich kvalitatívnej a kvantitatívnej analýze sa používajú separačné metódy. Prvoradý význam medzi nimi majú chromatografické metódy. Ich princípom je opakovane sa ustáľujúca rovnováha všetkých zložiek analyzovanej zmesi medzi dvomi vzájomne sa nemiešateľnými fázami. Jedna z nich je nepohyblivá — stacionárna fáza, má v rôznej miere schopnosť zadržiavať jednotlivé zložky analyzovanej

zmesi. Druhá pohyblivá — mobilná fáza vymýva/eluuje jednotlivé zložky zo stacionárnej fázy a vynáša ich v smere toku rôznou rýchlosťou a tým dochádza k ich vzájomnému deleniu. Stacionárna fáza môže byť pevná (sorbent) alebo kvapalná, mobilná fáza môže byť kvapalná (elučné činidlo) alebo plynná (nosný plyn). Hybnou silou je tok mobilnej fázy, ktorá unáša ióny alebo molekuly. Vlastné delenie látok ale závisí na brzdiacej sile (retencii), ktorá pôsobí selektívne (každá látka je brzdená inak). Pri chromatografii sa ustáľuje dynamická rovnováha medzi vratnou sorpciou na stacionárnej fáze a desorpciou do mobilnej fázy. Rýchlosť postupu látky závisí od sorpčnej rovnováhy — čím pevnejšie sa látka sorbuje na stacionárnu fázu, tým pomalšie v chromatografickom systéme postupuje.

Rozdelenie chromatografických metód je možné z hľadiska viacerých aspektov, ako je použitá technika (papierová, na tenkej vrstve, gélová, kvapalinová, plynná, ionovýmienná), ďalej skupenstva mobilnej a stacionárnej fázy (chromatografia kvapalina–tuhá látka, kvapalina–kvapalina, plyn–kvapalina, plyn–tuhá látka), taktiež priestorového usporiadania (planárna/plošná—vrstva sorbentu na vhodnej podložke, alebo stĺpcová — stacionárna fáza je v kolóne) pričom kolónová je účinnejšia s vyššou kapacitou vzoriek, využívaného separačného deja (adsorpčná, rozdeľovacia, gélová, iónová) a spôsobu vyvíjania (elučná, vytesňovacia, frontálna).

Delenie látok, v dôsledku rôznej adsorpcie zložiek analyzovanej vzorky, ktorá sa pohybuje, na povrch stacionárnej fázy — adsorbentu je princípom adsorpčnej chromatografie. Najčastejším adsorbentom býva silikagel včítane jeho mnohých modifikácií C_1 - C_∞) alebo ďalšie látky (oxid hlinitý, horečnatý, práškovaná celulóza atď.). Pohyblivú fázu tvoria čisté rozpúšťadla, alebo ich zmesi. Rozpúšťadlá sú zoradené na základe ich elučnej schopnosti (alebo podľa polárnosti) do eluotropného radu: voda > metanol > etanol > izopropanol > propanol > acetonitril > etylacetát > acetón > metyletylketón > tetrahydrofurán > dichlormetán > chloroform > dietyléter > benzén > toulén > tetrachlórmetán > cyklopentán > cyklohexán > hexán > pentán > perfluorované alkány.

Po nastreknutí vzorky do chromatografického systému dochádza premývaním mobilnou fázou k elúcii — vyvíjaniu/vynášaniu vzorky. Najskôr vychádza látka najmenej adsorbovaná, postupne jednotlivé zložky adsorbované silnejšie. Elúciu chromatografického systému je možné realizovať viacerými spôsobmi. Najjednoduchší z nich je izokratický, kedy sa chromatografický systém premýva stále rovnakou mobilnou fázou až do oddelenia — separácie jednotlivých zložiek. Ďalším spôsobom je gradientový, počas ktorého sa plynule mení pH, iónová sila t.j. koncentrácia polárnejšej zložky v mobilnej fáze. Pri viacstupňovom

spôsobe sa menej polárnym rozpúšťadlom eluujú niektoré zložky, ďalšie, ktoré sú sorbované silnejšie sa vymývajú polárnejším rozpúšťadlom.

Delenie látok v dôsledku ich rôznych rozdeľovacích koeficientov je základom rozdeľovacej chromatografie. Na internom nosiči, ktorým môže byť napr. silikagel, celulóza, je zakotvená stacionárna kvapalná fáza napr. voda. Po nanesení vzorky zmesi dochádza pri prechode mobilnej fázy, ktorou býva organické rozpúšťadlo nemiešateľné so stacionárnou fázou k opakovanému rozdeľovaniu — extrakcii zložiek zmesi medzi obidve kvapalné fázy. Elúcia prebieha podobne ako pri adsorpčnej chromatografii. Na delenie menej polárnych látok sa využíva hlavne v kvapalinovej chromatografii upravená forma rozdeľovacej chromatografie. Obrátená fáza (reversed phase — RP), kde organické hydrofóbne rozpúšťadlo slúži ako ukotvená stacionárna fáza a mobilná fáza je hydrofilné rozpúšťadlo.

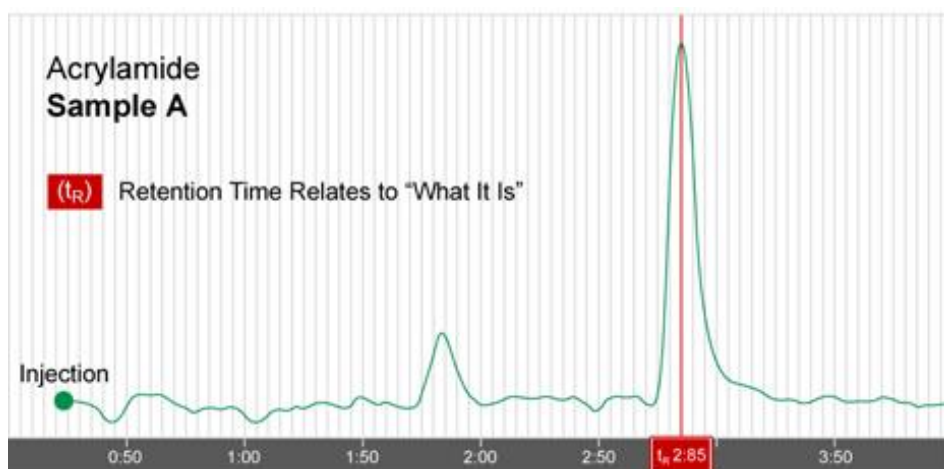
2.3.6.1 Vysokoučinná kvapalinová chromatografia

Vysokoučinná kvapalinová chromatografia (HPLC) je jedným z najúčinnjších nástrojov analytickej chémie na separáciu, identifikáciu a kvantifikáciu zložiek prítomných vo vzorkách a ktoré sú rozpustné v kvapalinách. Princípom HPLC je rozdiel v distribúcii látok medzi dve nemiešateľné fázy, kde mobilnou fázou je kvapalina, ktorá prechádza stacionárnou fázou naplnenou v kolóne. Delenie látok, v dôsledku rôznej adsorpcie zložiek analyzovanej vzorky, ktorá sa pohybuje, na povrch stacionárnej fázy — adsorbentu je princípom adsorpčnej chromatografie. Najčastejším adsorbentom býva silikagel alebo ďalšie látky, vid' vyššie. Pohyblivú fázou tvoria čisté rozpúšťadlá, alebo ich zmesi.

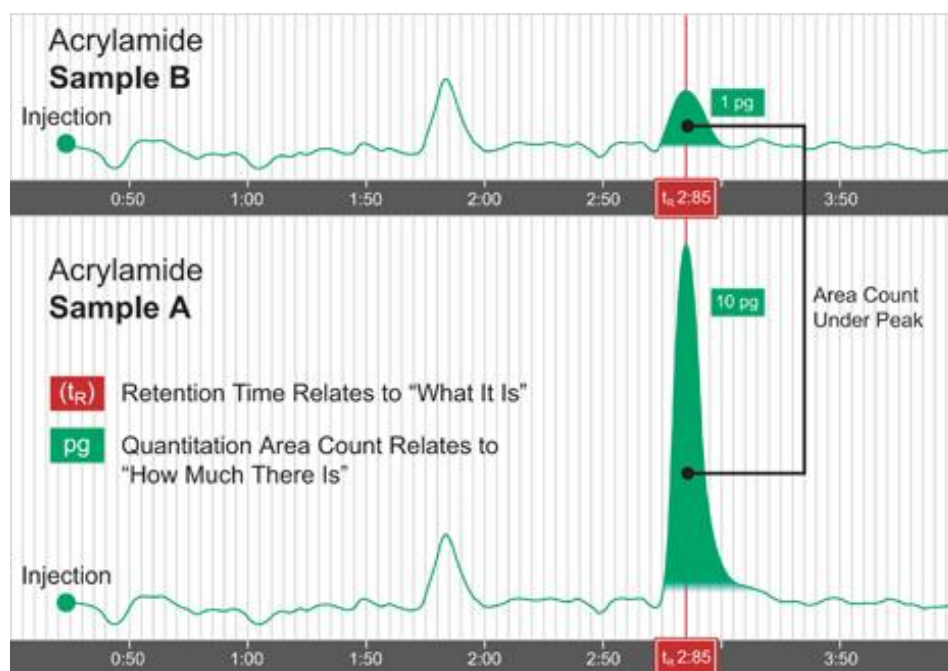
Hlavným výstupom je signál z detektora, ktorý sa zapisuje do chromatogramu. Je to grafický záznam odozvy detektora, koncentrácie látky alebo inej veličiny použitej ako miera tejto koncentrácie v závislosti na čase, objeme alebo vzdialenosti. V ideálnom prípade chromatogram predstavuje rad symetrických píkov rozdelených navzájom medzi sebou na základnú líniu. Tento chromatogram je možné použiť pre kvalitatívne aj kvantitatívne hodnotenie.

Každá látka sa eluuje zo systému v špecifickom čase meranom od momentu nadávkovania do systému po maximum píku. Kvalitatívne hodnotenie je možné na základe porovnania retenčného času známej referenčnej látky eluovanej z chromatografického systému za rovnakých podmienok (mobilná a stacionárna fáza). Príklad ilustruje Obrázok 2.10.⁶⁰ Kvantitatívne zastúpenie zložky je stanovované ako plocha pod píkom, ktorá sa integruje príslušným softvérom každého chromatografu. Obsah látky sa vždy určuje

vzhľadom na plochu štandardu (externého alebo interného), ktorého presnú koncentráciu poznáme. Príklad uvádza Obrázok 2.11.⁶⁰



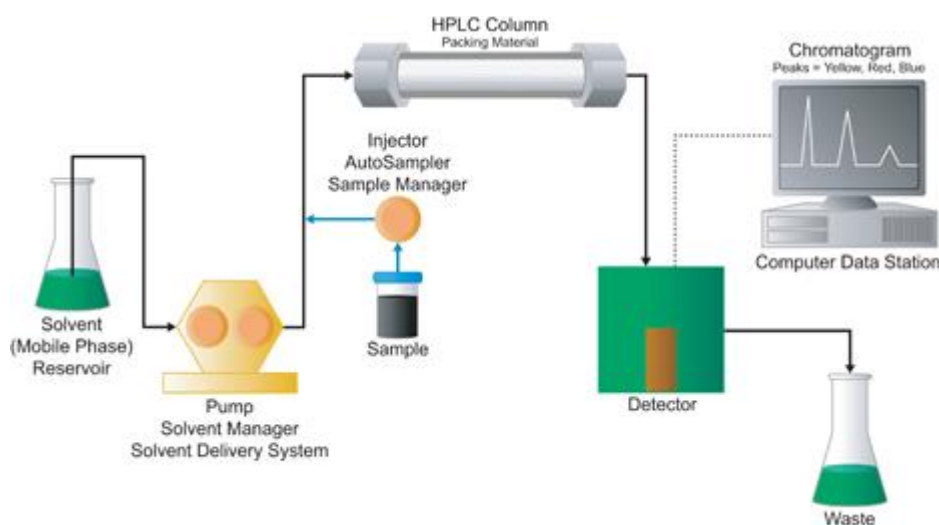
Obrázok 2.10 Kvalitatívne hodnotenie látky (identifikácia)⁶⁰



Obrázok 2.11 Kvalitatívne a kvantitatívne hodnotenie látky (identifikácia)⁶⁰

Použitie chromatografické podmienky musia zabezpečiť dostatočné oddelenie jednotlivých pík od ostatných zložiek. Na hodnotenie kvality separácie sú zadané parametre, ktoré daný chromatografický systém popisujú. Jedná sa napr. o rozlíšenie, tvar píku — symetria. Kvalitu kolóny vyjadruje počet teoretických priehradiek čím je ich počet vyšší, tým je lepšia aj separácia. Chromatografická metóda musí byť pre stanovenie dostatočne selektívna.

Prístroj je zložený z pumpy, autosamplera, detektora, termostatu chromatografickej kolóny a softvéru na spracovanie nameraných dát. Mobilná fáza je do chromatografického systému čerpaná konštantnou rýchlosťou z jedného alebo viacerých zásobných fliaš vysokotlakým alebo nízkotlakým čerpadlom, ktoré musí mať zabezpečený bezpulzný tok mobilnej fázy o rýchlosti od 0,1 — 10 ml/min za tlaku do 400 bar. Pri vyšších tlakoch až do 1 000 bar hovoríme o ultra vysokoúčinnnej kvapalinovej chromatografii (UHPLC). Najčastejšie sa používajú UV-VIS detektory, ktoré musia byť univerzálne, s citlivosťou pre koncentrácie v rozsahu ng — µg/ml, s odozvou, ktorá nezávisí na zmene zloženia mobilnej fázy a dosahujú požadovanú reprodukovateľnosť a linearitu odozvy. Vlnová dĺžka býva voliteľná od 190 — 800 nm. Detektory s diódovým poľom snímajú celé absorpčné spektrum niekoľkokrát za sekundu a výsledkom je 3D chromatogram závislosti absorpcie na vlnovej dĺžke a na čase. Podľa vlastností látok, prípadne účelu analýzy sa môžu použiť fluorescenčné spektrometre, detektory refraktometrické, elektrochemické, fluorimetrické a hmotnostné. Jednotlivé časti chromatografického systému schematicky zobrazuje Obrázok 2.12.⁶⁰

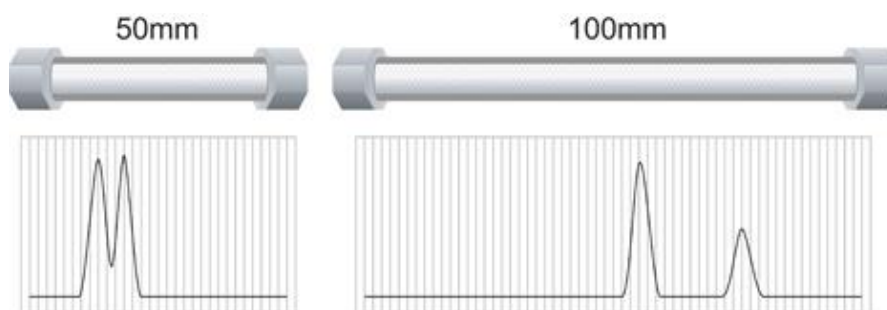


Obrázok 2.12 Schéma HPLC systému⁶⁰

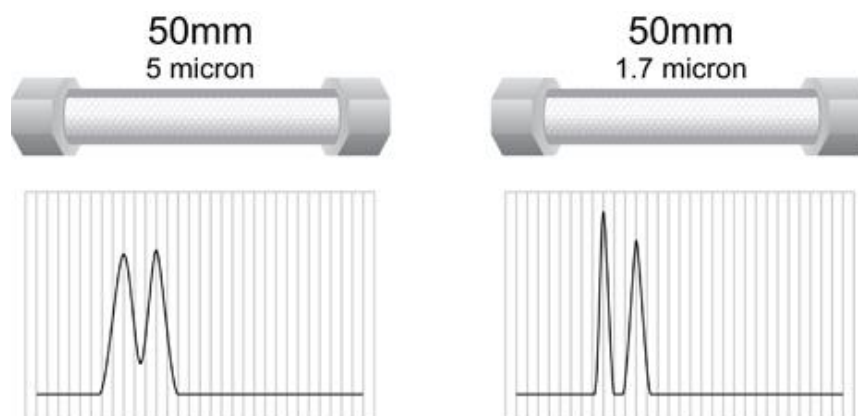
UHPLC technika (termíny UHPLC a UPLC sú synonymá) je zavádzaná postupne do praxe od roku 2004, kedy rozvojom inštrumentácie a špeciálnych typov kolón sú dosahované vyššie hodnoty parametrov ako rozlíšenie, rýchlosť analýzy a citlivosť. Na dosahovanie novej úrovne stanovenia sú potrebné kolóny s menšími časticami 1,7 µm.⁶¹

Miera, do akej sú dve zlúčeniny oddelené, sa nazýva rozlíšenie [R]. Dva hlavné faktory, ktoré určujú celkovú silu separácie alebo rozlíšenie, ktoré môže byť dosiahnuté za pomoci HPLC kolóny sú: sila mechanickej separácie, ktorá je tvorená dĺžkou kolóny, veľkosťou

častíc a sila chemickej separácie, vytvorená fyzikálno-chemickou „súťažou“ jednotlivých zložiek medzi stacionárnou a mobilnou fázou. Účinnosť je miera mechanickej separačnej sily, zatiaľ čo selektivita je mierou sily chemickej separácie. Porovnanie uvádzajú Obrázok 2.13, Obrázok 2.14.⁶¹ Zložky v zmesi prechodom cez kolónu integrujú na povrchu náplne kolóny alebo difundujú do pórov náplne, kde dochádza k deleniu. Pre náplne s časticami nižšími ako 2 μm , je difúzna dráha medzi vzorkou analytu a stacionárnej fázy kratšia a účinnosť vyššia. Náplne kolón časticami s pevným jadrom, ktoré sú teraz na vzostupe, je pevné jadro obalené na povrchu tenkou vrstvou malých čiastočiek, takže difúzna cesta je stále menšia a účinnosť je vyššia, ale stále závisí na hrúbke vrstvy častíc okolo pevného jadra. Obrázok 2.15⁶² zobrazuje vplyv veľkosti častíc na ich základe prepočítaný prietok na dĺžku analýzy.



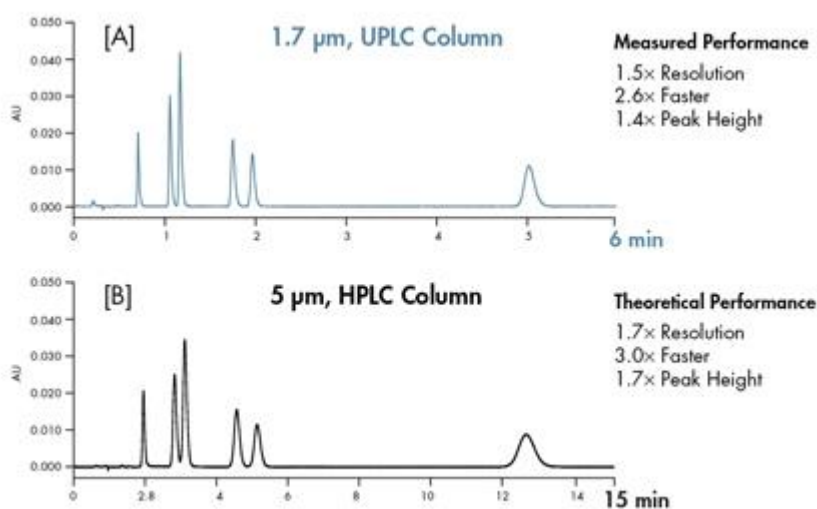
Obrázok 2.13 Mechanická separačná sila v závislosti na dĺžke kolóny pri rovnakej veľkosti častíc⁶¹



Obrázok 2.14 Mechanická separačná sila v závislosti na veľkosti častíc pri rovnakej dĺžke kolóny⁶¹

Okrem trendu zmenšovania veľkosti častíc náplne kolón je aj ďalší smer a to využívanie monolitických kolón. Náplň je tvorená z jednoliatej tyčinky z poróznej kremíkovej náplne. Tieto kolóny majú hustú sieť makropórov a mezopórov, vďaka čomu vzorky a mobilná fáza preteká cez kolónu kratší čas ako kolónami na báze častíc. Skracuje sa čas analýzy takmer o polovicu oproti bežne používaným časticovým kolónam za nízkeho spätného tlaku v systéme, je možné dosahovať vysoké prietoky cez kolónu vďaka vysokej porozite.

Je zvýšená reprodukovateľnosť a aj životnosť kolóny. Porovnanie náplne kolón znázorňuje Obrázok 2.16.⁶³



Obrázok 2.15 Separácia bola vykonaná na dvoch kolónach s rovnakými rozmermi [2,1 × 50 mm]. Identické chromatografické podmienky boli použité pri oboch separáciách s výnimkou prietoku, ktorý bol prepočítaný na základe veľkosti častíc⁶²



Obrázok 2.16 Porovnanie náplne monolitickej (vľavo) a časticovej (vpravo) kolóny⁶³

2.3.7 Hmotnostná spektrometria

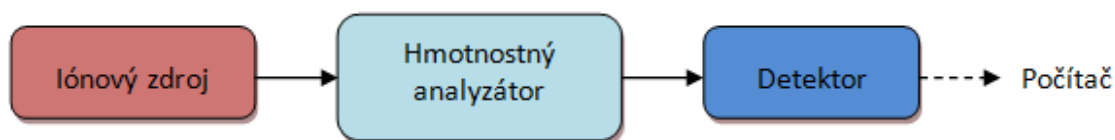
Hmotnostná spektrometria (Mass Spectrometry, MS) je vysoko citlivá analytická metóda s nízkou spotrebou vzorky. Je to metóda deštruktívna, ale je možné ju použiť na identifikáciu neznámych zlúčenín, kvantifikáciu známych zlúčenín, stanovenie fyzikálnych a chemických vlastností molekúl a iónov, k objasňovaniu štruktúry iónov v plynnej fáze. Hoci pri tejto metóde nedochádza k interakcii elektromagnetického žiarenia s hmotou,

ako je to u klasických spektrálnych metód, je aj táto metóda zaradená medzi spektrálne techniky a to pre podobné využitie na stanovenie štruktúrnej analýzy, ako aj pre podobnosť nameraných záznamov — hmotnostných spektier.

V priebehu analýzy hmotnostnej spektrometrie, sa analyt spravidla odparuje a k separácii iónov dochádza vo vákuu prechodom magnetickým a elektrickým poľom. Výstupom sú hmotnostné spektrá, kde je vyjadrená závislosť intenzity na pomere hmotnosti a náboja (m/z).^{26,64}

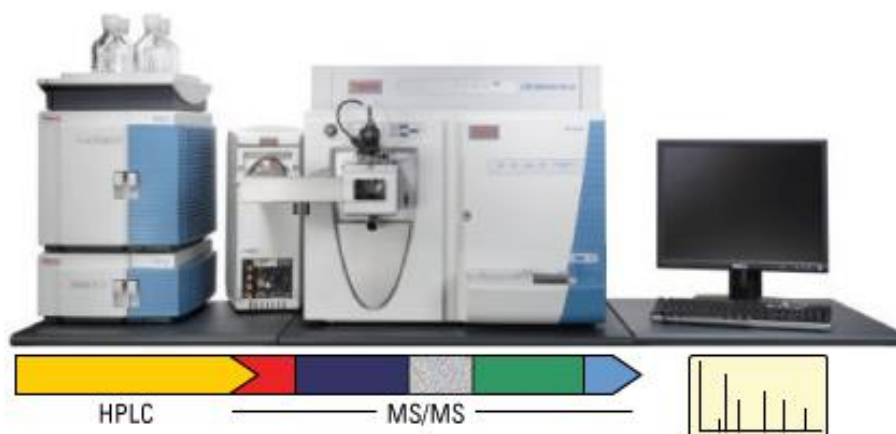
Touto metódou sa prevádzajú molekuly na ióny a využíva sa delenie nabitých ionizovaných častíc zo vzorky na základe ich hmotností vo vákuu pri prechode magnetickým a elektrickým poľom. Hmotnostný spektrometer meria hmotnosť molekuly až potom čo prevedie ionizáciu molekúl. Po dodaní elektrického náboja molekule sa prevádza výsledný tok elektricky nabitých iónov na zodpovedajúci elektrický prúd, ktorý je systém schopný zaznamenať. Dátový systém prevádza prúd na digitálne informácie, pričom sa zobrazí ako hmotnostné spektrum.

Hlavné procesy, ktoré prebiehajú v hmotnostnom spektrometri sú ionizácia analytu — prevádzanie neutrálnych molekúl na nabité častice, delenie vzniknutých iónov v hmotnostnom analyzátore podľa pomeru ich m/z a ich následná detekcia, vid' Obrázok 2.17. Výstupom je hmotnostné spektrum vyjadrené ako závislosť intenzity na pomere hmotnosti a náboja (m/z). Vo väčšine prípadov sú hmotnostné spektrá zobrazované v normalizovanom tvare – najintenzívnejší pík má hodnotu 100% (relatívna intenzita) a intenzity ostatných píkov sa následne dopočítavajú. Tento spôsob vyjadrenia je používaný pre grafickú, ako aj pre tabuľkovú formu.⁶⁵



Obrázok 2.17 Schéma hmotnostného spektrometra

Meranie môže byť priame pre kvapalné alebo tuhé vzorky s použitím vyhrievaného zásobníka a sondy, alebo v spojení cez špeciálne rozhranie podľa použitej inej separačnej techniky ako je plynová chromatografia — GC, kvapalinová chromatografia — LC (vid' Obrázok 2.18), kapilárna elektroforéza — CE (GC-MS, LC-MS, CE-MS). Veľmi dôležitou časťou je vákuový systém. Vákuum bráni kolízii iónov s neutrálnymi atómami a tak zaisťuje iónom dostatočne dlhú voľnú dráhu.²⁶



Obrázok 2.18 Príklad zapojenia LC-MS systému (Thermo Scientific LTQ Orbitrap Velos Mass Spectrometer s HPLC)⁶⁶

2.3.7.1 Iónové zdroje

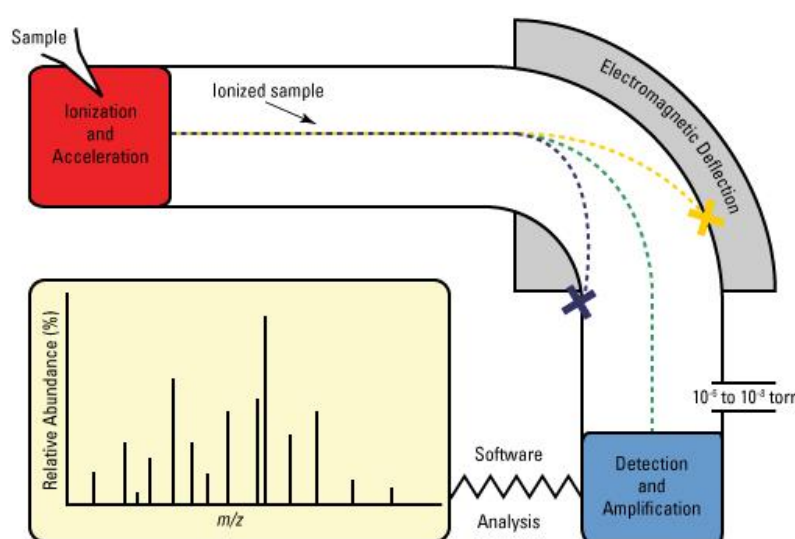
Iónový zdroj hmotnostného spektrometra slúži na prevedenie neutrálnych molekúl analytu na nabitú časticu iónu. Ionizačné techniky, vid' Tabuľka 2.3, závisia od vlastností vzorky (prchavosť, polarita, tepelná stabilita, molekulová hmotnosť, čistá látka, zmes). Podľa prebytku ich vnútornej energie, ktorá vedie k fragmentácii ionizovanej molekuly je možné ich rozdeliť na tvrdé ionizačné techniky (EI) kedy ionizovaná molekula ionizáciou získava nadbytok vnútornej energie čo má za následok vznik menších častí tzv. fragmentové ióny. Mäkké ionizačné techniky sú šetrnejšie a molekula získava oveľa menšie množstvo energie oproti EI a preto vznikajú hlavne (de)protonované molekuly a len minimálne množstvo fragmentovaných iónov. Ionizácia môže prebiehať pri zníženom tlaku (EI, CI, MALDI) alebo pri atmosférickom tlaku (ESI, APCI, APPI).

Tabuľka 2.3 Rozdelenie ionizačných techník

Typ ionizácie	Názov	Spôsob ionizácie	Použitie
tvrdá	Elektrónová ionizácia (Electron Ionization) EI	Katóda emituje elektróny, ktoré sú po prechode iónovým zdrojom zachytené na anóde. Priblížením emitujúceho elektrónu k valenčným elektrónom molekuly dochádza k ovplyvneniu ich magnetických polí čo môže viesť k uvoľneniu valenčného elektrónu a vzniku radikalkatiónu. Vzniknuté ióny sú vytesňovacie elektródou vypudzované z iónového zdroja a ďalej usmerňované a urýchľované ďalšími elektródami smerom do analyzátoru.	dostatočná prchavosť - k ionizácii prichádza v plynnej fáze pri teplotách 150 — 400 °C a zároveň aj termostabilita látky
	Chemická ionizácia (Chemical Ionization) CI	Analyt sa prevádza rovnako do plynnej fázy ako pri EI, ale je prítomný aj reakčný plyn, ktorý je v nadbytku približne 10000 : 1 a pri tlaku asi 100 Pa aby sa zaručilo dostatočné množstvo zrážok. Najskôr sa ionizujú molekuly reakčného plynu a potom molekuly analytu. Reakčným plynom býva napríklad metán, izobután, amoniak.	CI bola vyvinutá ako alternatíva k EI, ktorá spôsobovala veľmi silnú defragmentáciu následkom čoho niektoré látky nebolo možné identifikovať.
	Ionizácia urýchlenými atómami alebo iónmi (Fast Atom Bombardment) FAB, (Fast Ion Bombardment) FIB	Pre FAB sa používajú vysokoenergetické neutrálne molekuly vzácnych plynov (xenón, argón) vo viskóznej matrici, ktorá predlžuje životnosť vzniknutých iónov. Najbežnejšie používanou matricou býva glycerol, tioglycerol, trietylamín. Pre FIB sa používajú urýchlené ióny predovšetkým Cs ⁺ .	Ionizácia urýchlenými atómami alebo iónmi majú veľmi podobný princíp, použitie, prípravu vzorky aj výsledky. Líšia sa iba prítomnosťou alebo neprítomnosťou náboja bombardujúcich častíc.
jemná	Ionizácia laserom za účasti matrice MALDI (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization)	Vzorka sa najskôr rozpúšťa, mieša s vhodnou matricou a následne sa zbavuje rozpúšťadla. Povrch sa vo vákuu následne ostreľuje krátkymi laserovými pulzami. Táto technika je najčastejšie prepojená s analyzátorom doby letu (TOF).	Umožňuje analyzovať pomocou hmotnostnej spektrometrie aj také molekuly ako sú peptidy, proteíny, nukleové kyseliny čo malo veľký prínos pre oblasť biochémie.
	Ionizácia termosprejom (Thermospray Ionization) TSI	prvá ionizačná technika vyvinutá pre spojenie s HPLC-MS	dnes už je nahrádzaná ESI
	Ionizácia elektrosprejom (Electrospray Ionization) ESI	Analyt sa rozpúšťa vo vhodnom rozpúšťadle a privádza kovovou kapilárou, na ktorú sa privádza vysoké napätie 3 – 5 kV, do iónového zdroja. Na výstupe z kapiláry dochádza k rozprášeniu nabitých drobných kvapôčok použitím dusíka. Po odparení rozpúšťadla dochádza ku Coulombickej explózií – zmenšováním povrchu a objemu kvapôčok následkom odparovania rozpúšťadla narastá povrchová hustota náboja a po dosiahnutí kritickej hranice dochádza k rozpadu nabitých kvapôčok na množstvo ešte menších nabitých kvapôčok. Tento proces sa opakuje tak dlho, až je kvapôčka dostatočne malá a môže nastať desorpcia protónovanej a deprotónovanej molekuly z povrchu.	Momentálne najrozšírenejšou a najšetnejšou ionizačnou technikou pre spojenie LC-MS aj pre analýzu termolabilných látok.
	Chemická ionizácia za atmosferického tlaku (Atmospheric Pressure Chemical Ionization) APCI	Molekuly sa ionizujú koronárnym výbojom.	Štandardná ionizačná šetrná technika pre spojenie LC-MS. Je tolerantná k prítomnosti pufrov v mobilnej fáze a k zmenám podmienok experimentu ako je napr. gradientová elúcia.
	Fotoionizácia za atmosferického tlaku (Atmospheric Pressure Photoionization) APPI	Podobná APCI, ale ionizácia sa dosahuje ultrafialovým žiarením kryptónovej výbojky.	

2.3.7.2 Hmotnostné analyzátory

Hmotnostný analyzátor, vid' Obrázok 2.19 slúži na delenie iónov v plynej fáze za vákua podľa pomeru ich hmotnosti a náboja (m/z). Delenie iónov je možné dosiahnuť na základe rôznych fyzikálnych princípov ako je zakrivenie dráhy letu iónov v magnetickom alebo elektrickom poli, rôznej stability oscilácie iónov v dvojrozsmernej alebo trojrozsmernej kombinácii jednosmerného a vysokofrekvenčného striedavého napätia (kvadrupól alebo iónová pasca), rôznej rýchlosti letu iónov (TOF), rôznej frekvencie harmonických oscilácií v Orbitrape, rôznej absorpcie energie pri cykloidálnom pohybe iónov v kombinovanom magnetickom poli (iónová cyklotrónová rezonancia — ICR).



Obrázok 2.19 Schéma jednotlivých častí hmotnostného spektrometra⁶⁷

Typ analyzátoru ovplyvňuje kvalitu získaných hmotnostných spektier ale aj cenu hmotnostného spektrometra. Pre hodnotenie vlastností analyzátorov je dôležitá veličina rozlišovacia schopnosť (R), ktorá je vyjadrená ako pomer hmotnosti iónov m_1 a rozdielu hmotnosti iónov m_1 a m_2 s jednotkovým nábojom pričom píky oboch iónov sú rovnako vysoké a ich údolie je v 10% ich výšky. Typy hmotnostných analyzátorov uvádza Tabuľka 2.4.

$$R = \frac{m_1}{(m_1 - m_2)}$$

Tabuľka 2.4 Rozdelenie hmotnostných analyzátorov

Spôsoby detekcie	Názov detektora	Princíp
magnetická	Magnetický sektorový analyzátor	Zakrivenia dráhy letu iónov pri prechode magnetickým poľom. Dráhy ťažších iónov sa nezakrivia toľko pôsobením odstredivej sily.
	Magnetický sektorový analyzátor s dvojitou fokusáciou iónov	Navyše pridaná elektrostatická fokusácia (zaostrenie) iónov. Ióny, ktoré vznikajú v iónovom zdroji majú určitú distribúciu kinetických energií a pri vstupe do elektrického poľa prichádza k zakriveniu dráhy v závislosti na ich E_k bez vplyvu hodnoty m/z .
kvadrupólová	Kvadrupólový analyzátor	Tvorí ho štyri kovové tyče kruhového prierezu o dĺžke 20 — 30 cm, kde je na dve protiľahlé vložené kladné jednosmerné napätie a na zvyšné dve záporné jednosmerné napätie (U). Na všetky štyri tyče je superponované vysokofrekvenčné striedavé napätie (V). Ión, ktorý je privedený do stredu osy kvadrupólu začne oscilovať. Pre ión s určitou hodnotou m/z sú v danom časovom okamžiku stabilné oscilácie pre určitý pomer U/V . Prechádza kvadrupólom a dostáva sa na detektor. Všetky ostatné ióny sú zachytené na tyčiach kvadrupólu. Plynulou zmenou hodnôt jednosmerného napätia U a striedavého napätia V , pri ich rovnakom pomere, sú na detektor postupne prepúšťané všetky ióny.
	Trojité kvadrupólový analyzátor (QqQ)	Jedná sa o 3 kvadrupóly zoradené za sebou kde prostredný z nich slúži ako kolízna cela so zavedeným kolíznym plynom a prichádza tak ku kolíznej excitácii vybraných iónov z kvadrupólového analyzátoru Q1 a ich následnej fragmentácii. Vzniknuté fragmenty sú potom analyzované pomocou Q3.
	Iónová pasca	Je to typ analyzátoru tvoreného prstencovou elektródou a dvomi koncovými elektródami. Na elektródy je vložené napätie. Vhodnými pomermi napätia vloženými na kruhovú a dve koncové elektródy sú ióny zadržované vo vnútri pasce. Postupnou zmenou napätia sú výstupným otvorom vypudzované na detektor na základe ich m/z .
	Orbitrap	Ióny po rozdelení v hmotnostnom analyzátoe dopadajú na detektor iónov, ktorý z nich generuje signál buď tvorbou sekundárnych elektrónov, ktoré následne zosilňuje, alebo indukciou prúdu po dopade iónov.
	Analyzátor doby letu TOF	Analyzátor doby letu (Time of Flight) meria dobu letu iónov potrebné na prekonanie určitej dráhy. Ióny sú urýchľované napäťovým pulzom do letovej trubice, čo je oblasť bez poľa, kde letia rôznou rýchlosťou v závislosti od ich m/z a tak dopadajú na detektor v rôznom čase (malé ióny letia vyššou rýchlosťou). Jeho výhodou je veľmi rýchle skenovanie a nie je obmedzený hmotnostným rozsahom.
	Iónový cyklotrónová rezonancia s Fourierovou transformáciou FT-ICR	Po vstupe do cely FT-ICR, ktorá je umiestnená v strede veľmi silného magnetického poľa, ióny rotujú v rovine kolmej na vektor magnetickej indukcie s frekvenciou, ktorá je funkciou ich m/z . Následne sú ióny excitované v širokom pásme frekvencií a ión začne rezonovať. Polomer jeho trajektórie sa zväčší a jeho rotácia môže byť zaznamenaná vo forme indukovaného prúdu na platni prijímača. Ak hodnota frekvencie vloženého napätia lineárne stúpa budú postupne rezonovať všetky prítomné ióny.

Orbitrap (vid' Obrázok 2.20) patrí medzi najnovšie typy hmotnostných analyzátorov s nižšou rozlišovacou schopnosťou a správnosťou určenia hmoty ako má FT-ICR, ale zase pre použitie v praxi má výrazne nižšie obstarávacie náklady. Skladá sa z vonkajšej a stredovej vretenovej elektródy, na ktoré je vložené napätie. Úzky zväzok iónov s určitou hodnotou m/z vstupuje

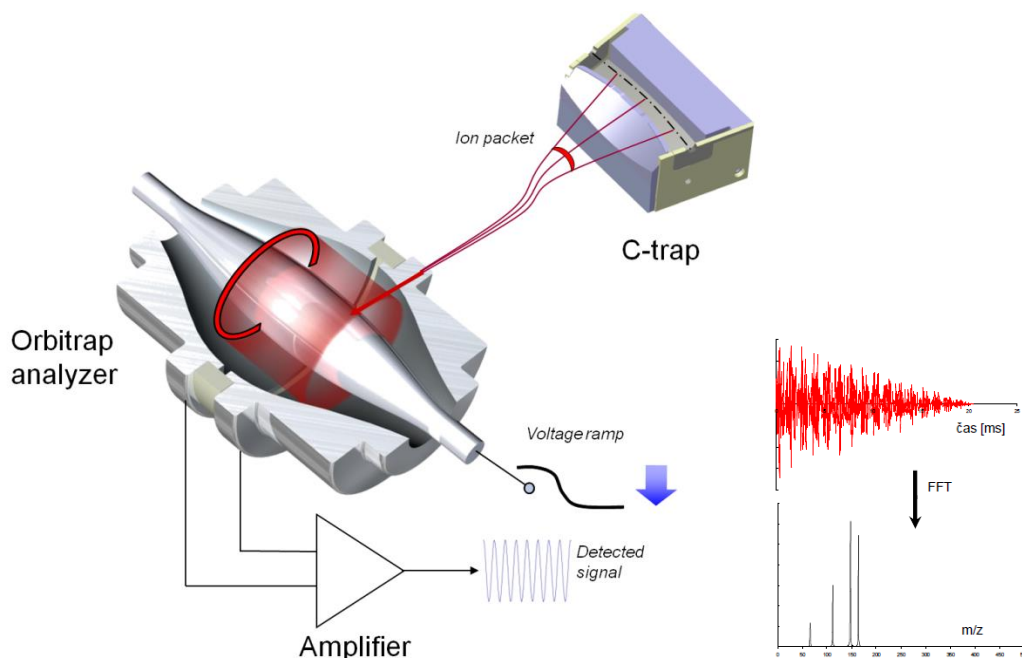
do elektrického poľa, zvyšujúce sa napätie stláča ióny. Ióny sa pohybujú okolo alebo pozdĺž stredovej elektródy. Stabilizuje sa napätie a následne sa stabilizuje aj dráha iónov. Uholové rozšírenie vytvára rotujúci prstenec iónov. Frekvencia axiálnej oscilácie pozdĺž osi z - ω_z je nepriamo úmerná odmocnine m/z .

$$\omega_z = \sqrt{\frac{k}{m/z}}$$

ω_z – frekvencia axiálnej oscilácie [rad/s]

k – zakrivenie poľa

Oscilujúce ióny indukujú na vonkajších elektródach striedavý prúd, ktorý sa zosilňuje a je digitalizovaný. Hmotnostné spektrum sa skladá po Fourierovej transformácii signálu.



Obrázok 2.20 Schéma Orbitrap analyzátora⁶⁸

2.3.7.3 Detekcia iónov

Ióny po rozdelení v hmotnostnom analyzátore dopadajú na detektor iónov, ktorý z nich generuje signál buď tvorbou sekundárnych elektrónov, ktoré následne zosilňuje, alebo indukciou prúdu po dopade iónov. Detektory iónov používajú všetky analyzátory okrem FT-ICR a Orbitrap, kde je v analyzátore vykonávaná zároveň aj detekcia.

Najbežnejším typom je typ elektrónového násobiča, kedy ióny dopadajú na povrch dynódy vyrazia z nej e^- , ktoré sú ďalej zosilňované systémom dynód alebo opakovanými kolíziami na priebežne zakrivenej dynóde. Dosahuje sa zosilnenie 10^8 krát.

Ďalším typom je fotonásobič, kde ióny po dopade na konverznú dynódu uvoľnia e^- , dopadom na fosforovú platňu uvoľnia fotóny, ktoré sa ešte zosilňujú vo fotonásobiči až $10^5 - 10^7$ krát. Ich životnosť je dlhšia.

Faradayova klietka je ďalším typom robustného ale menej citlivého detektora, ktorý je vhodný na veľmi presné izotopické merania. Dopadajúce ióny narážajú na povrch dynódy, ktorá emituje e^- a indukuje sa prúd, ktorý je následne zosilnený a zaznamenaný.⁶⁹

2.3.7.4 Štruktúrna analýza pomocou hmotnostnej spektroskopie vo farmácii

Pre farmaceutickú oblasť je dôležitá úloha identifikácie hlavných látok a nečistôt od malých organických molekúl s relatívnou molekulovou hmotnosťou od 200 — 600 (ako sú zbytkové rozpúšťadlá, API a ich nečistoty) až po makromolekulové látky. Čiže praktické využitie MS metodiky vo farmaceutickom priemysle je od vývoja API, cez vývoj lieku, zadefinovanie špecifikačných a dynamických limitov. Citlivosť MS metódy je dôležitá pre rozlíšenie relatívne príbuzných metabolitov v zložitých maticiach a tak pre možnosť identifikovať a kvantifikovať metabolity.⁷⁰

Čisté a izolované látky je možné dávkovať priamo do MS systému, zatiaľ čo meranie spektier nečistôt je lepšie až po chromatografickej separácii. Kľúčovú úlohu pre získanie hmotnostného spektra má voľba vhodnej techniky. Na základe maximálne dostupných informácií pre riešenie a získaných poznatkov z interpretácie sa navrhuje možná štruktúra, ktorá by mala byť potvrdená alebo spresnená ešte ďalšou štruktúrno-analytickou metódou. MS systémy pre farmaceutické štruktúrne analýzy by mali umožniť meranie spektier širokej škály vzoriek a rôznych typov, preto napr. GC-MS systémy je vhodné prepojiť ako headspace dávkovaním plynnej fázy, tak split/splitless injektorom pre kvapalné vzorky. Vstup do MS systému je vhodné voliť tiež s použitím priamo vyhrievanej sondy. Pre HPLC systémy pre MS identifikáciu zlúčenín je dôležitá gradientová pumpa s veľkým rozsahom prietokov, kvalitné nástrekové zariadenie a termostatovaný priestor pre vzorky ako aj kolónu. Je vhodné predradenie UV detektora pre monitorovanie elúcie látok a nečistôt pred MS detektor. Mobilná fáza by mala byť ľahko odpariteľná s obsahom vody v gradiente s metanolom alebo acetonitrilom. Pre priame vstupy do MS systému je vhodné doplnenie lineárnej dávkovacej pumpy.

2.3.8 Termická analýza

Termín termická analýza vo všeobecnosti zahŕňa experimentálne metódy, pri ktorých sú analyzované zmeny zloženia a vlastností systému pri tepelnom zaťažení. Počas tepelného

zaťaženia vzorky nastáva vyvolanie alebo zmena intenzity procesu ako sú napríklad chemická reakcia, rozklad, dehydratácia, fázová premena, ktoré môžu byť sprevádzané zmenou hmotnosti, objemu, uvoľňovaním alebo spotrebou energie, zmenou vodivosti a pod. Podľa vlastnosti, ktorej zmena sa sleduje ako závislosť od teploty, je pomenovaná aj príslušná analýza. Prehľadné zobrazenie jednotlivých metód uvádza Tabuľka 2.5.⁷¹

Tabuľka 2.5 Prehľad metód termickej analýzy⁷¹

Metóda	Označenie	Sledovaná vlastnosť
Termogravimetrická analýza	TGA	hmotnosť — meria sa zmena hmotnosti v závislosti od teploty
Diferenčná termogravimetria	DTGA	hmotnosť — prvá derivácia zmeny hmotnosti
Diferenčná termická analýza	DTA	rozdiel teplôt — meria sa rozdiel teplôt medzi vzorkou a štandardom počas ohrevu alebo chladnutia
Diferenčná skenovacia kalorimetria	DSC	entalpia a tepelný tok — meria sa tepelný tok dodávaný referenčnej látke, tak aby bol nulový teplotný rozdiel medzi vzorkou a štandardom
Termomechanická analýza	TMA	rozmer a mechanické vlastnosti — sleduje sa deformácia vzorky pri zaťažení v závislosti od teploty
Termooptometria		optické vlastnosti — meria sa napr. celkové svetlo, alebo svetlo určitej vlnovej dĺžky, luminiscencia
Elektrická vodivostná analýza		elektrický odpor — meria sa zmena elektrického odporu

Termická analýza je širší pojem pre metódy, pri ktorých sa merajú fyzikálne a chemické vlastnosti látky, zmesi látok, reakčné zmesi ako závislosť od teploty alebo času pri riadenom teplotnom programe. Vzorka môže byť vystavená okrem toho aj iným vplyvom ako je reaktívna atmosféra, statické alebo dynamické mechanické zaťaženie. Základným javom dôležitým pre metódy termickej analýzy je zmena entalpie (ΔH). Každá látka sa dá charakterizovať obsahom voľnej entalpie (G), ktorá je daná vzťahom:

$$G = H - TS$$

H – entalpia

T – teplota

S – entropia

Každý systém sa snaží dosiahnuť stav, ktorému zodpovedá nižšia hodnota Gibbsovej voľnej energie. Príkladom je modifikačná premena látky z jednej kryštalickej formy na druhú, ktorá má pri danej teplote nižšiu hodnotu voľnej Gibbsovej energie — je stabilnejšia. K vytvoreniu kryštalickej štruktúry alebo stavu s nižšou hodnotou voľnej entalpie môže pri ohreve prechádzať aj cez jednotlivé medzistupne.⁷¹ Pri ohreve alebo ochladzovaní látky dochádza k reverzibilným, ale aj ireverzibilným zmenám, ktoré závisia od počiatočného stavu a teploty. Meranie môže byť ovplyvnené viacerými faktormi a to inštrumentálneho charakteru (tepelné zdroje, teplotný regulačný systém, systém merania teploty, systém záznamu termoanalytickej krivky, snímací systém), metodickými faktormi (zvolený teplotný program, vplyv atmosféry, usporiadanie meracieho systému, spôsob umiestnenia a úpravy vzorky) a samozrejme aj vlastnosťami meranej látky (veľkosť a tvar častíc, tepelná vodivosť vzorky, vplyv vlhkosti a zbytkových rozpúšťadiel, fyzikálne a chemické vlastnosti vzorky).⁷¹

Termické analyzátory pre jednotlivé termické metódy sa skladajú z týchto spoločných častí:

- zdroj tepla — pec z tepelne odolného materiálu podľa teploty použitia, kde elektrický ohrev je zabezpečený vinutím okolo pece
- meracie zariadenie — (termočlánky, termováhy), ktoré registruje zmeny vo forme elektrického signálu. Súčasťou meracieho zariadenia je držiak a nosič — kelímok pre umiestnenie vzorky
- vstup pre nosný plyn a výstup pre plynné produkty tepelného rozkladu⁷¹

Diferenčná skenovacia kalorimetria

Princíp tejto metódy spočíva v udržaní rovnakej teploty skúmanej vzorky a referenčnej vzorky, ktoré sú zahrievané súčasne vedľa seba. Udržanie nulového teplotného rozdielu sa dosahuje buď dodaním energie do vzorky (pokiaľ v nej prebieha endotermický dej), alebo do referenčnej látky (vo vzorke prebieha exotermický dej).

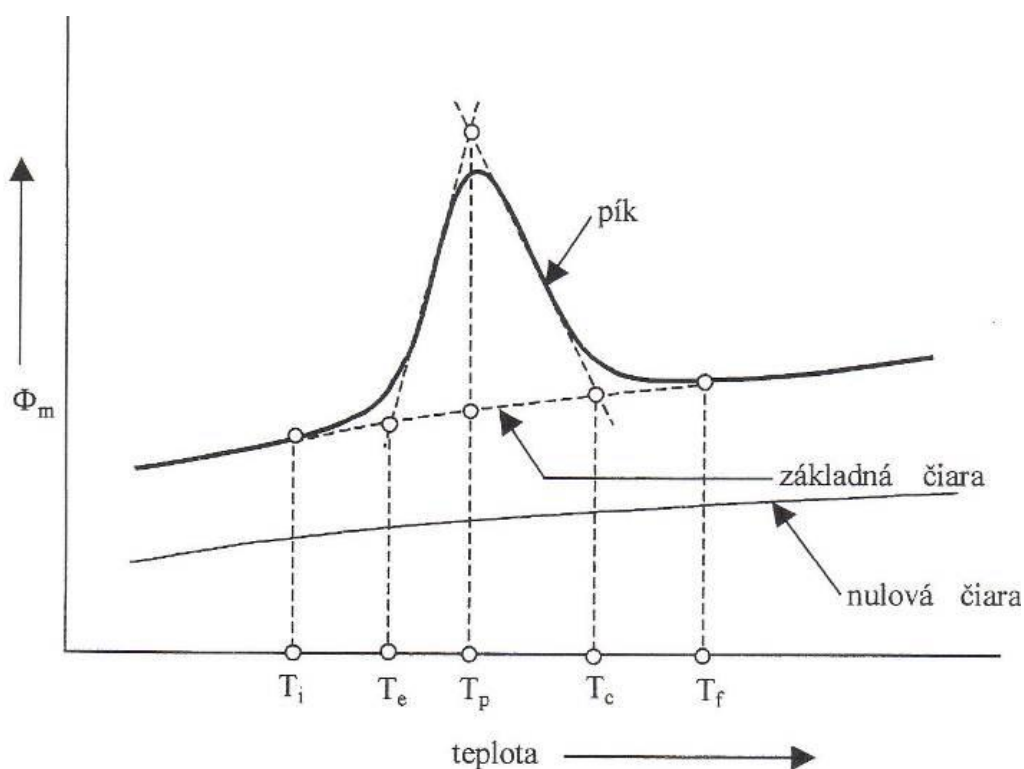
Používajú sa dva základné typy DSC analyzátorov:

- DSC s kompenzáciou príkonu — zachováva nulový teplotný rozdiel medzi meranou a referenčnou vzorkou. Sú potrebné dve oddelené cely a dva teplotné zdroje. Obe vzorky sú zahrievané rovnakou rýchlosťou.
- DSC s teplotným tokom — obe vzorky, meraná a aj referenčná, sú umiestnené na samostatných teplotných snímačoch v spoločnej kalorimetrickej cele. Meranie rozdielu príkonu je nahradené meraním rozdielu teplôt analyzovanej a referenčnej vzorky, ktoré sú spojené teplotným mostom.⁷¹

Použitie kalorimetrie vo farmaceutickom priemysle je obzvlášť užitočné v priebehu vývoja jednotlivých zložiek lieku, pretože umožňuje v časti vývoja vykonať analýzy kryštalického obsahu a overiť stabilitu. Zmena tepelnej kapacity väzieb v molekule, môže byť meraná pomocou diferenčnej skenovacej kalorimetrie a umožňuje detekovať body entalpie, charakterizovať a mapovať teplotné správanie špecifické pre produkt. Vo farmaceutickom využití kalorimetrie umožňujú overiť bod, v ktorom liek môže prechádzať z kryštalického alebo nestabilného stavu, čo je užitočné najmä v konečnom vývoji amorfných API.⁷²

2.3.8.1 Vyhodnocovanie DSC kriviek

Pri DSC je možné využiť vysokú rýchlosť ohrevu (0,2 — 80 °C/min). Plocha píku je priamo úmerná teplu uvoľňujúcemu sa, alebo spotrebovanému pri reakcii a výška píkov je priamo úmerná rýchlosti reakcie. Charakteristické pojmy DSC krivky znázorňuje Obrázok 2.21.



Obrázok 2.21 Krivka DSC: Nulová čiara je krivka nameraná s prázdny m zariadením, t. j. bez vzoriek a bez misiek, alebo bez vzoriek a s prázdny m miskami. T_i je počiatková teplota píku, T_e je extrapolovaný začiatok, T_p je maximálna teplota píku, T_c je extrapolovaný koniec, T_f je teplota konca píku.⁷¹

2.3.9 Analýza veľkosti a tvaru častíc

Tvar a veľkosť častíc sú dôležitými parametrami pri hodnotení predovšetkým vstupných surovín vo farmácii pretože tieto vlastnosti ovplyvňujú výrobu liekov, transport, rozpúšťanie,

absorpciu účinnej látky v tele, rýchlosť chemických reakcií. Ideálny práškový materiál obsahuje iba častice rovnakej veľkosti. Skutočný materiál sa skladá z častíc v určitom veľkostnom intervale. V praxi sa preto pri popise veľkosti používa pojem distribúcia veľkosti častíc.⁷³ Rozmery častíc práškových vstupných surovín sa pohybujú od mikroskopických až po viditeľné voľným okom. Podľa oblasti veľkosti častíc sa potom aj aplikujú rôzne analytické metódy, pretože majú svoje obmedzenia. Na analýzu vzorky so širokým intervalom častíc je možné kombinovať viaceré metódy, ale výsledky sa musia prepočítať na pôvodnú vzorku.²⁶

Výber metódy, vid' Tabuľka 2.6, závisí od predpokladaného rozsahu veľkostí častíc, ale aj na ich fyzikálno–chemických vlastnostiach (tvar častíc, morfológia povrchu, zmáčavosť, rozpustnosť), rýchlosť merania, presnosť merania a dostupnosti zariadenia.²⁶ Tvar častíc je takisto dôležitým parametrom ich hodnotenia. Veľkosť a tvar sú neoddeliteľné parametre, ktoré ovplyvňujú chovanie pevných látok a ich spracovanie.^{74,75}

Tabuľka 2.6 Prehľad metód na určovanie veľkosti častíc²⁶

Metóda	Oblasť použitia
1. Sitovacia analýza	20 μm až mm
2. Mikroskopické metódy	
a) svetelná mikroskopia	0,5 – 250 μm
b) elektrónová mikroskopia	0,001 – 100 μm
3. Sedimentačné a elutričné metódy	
a) sedimentácia v kvapaline	1 – 1000 μm
b) sedimentácia v plyne	1 – 100 μm
c) sedimentácia v odstredivom poli	0,001 – 5 μm
d) elutriácia (rozplavovanie)	1 – 200 μm
4. Metódy založené na ohybe a rozptyle svetla	nm – 1000 μm

Veľkosť a tvar častíc ovplyvňujú nielen tokové vlastnosti práškových látok, ale takisto procesy mletia, homogenizácie, granulácie a tabletovania. Pri homogenizácii účinnej látky s pomocnými látkami je vhodné, aby distribúcia ich veľkostí nebola príliš rozdielna. S narastajúcim rozdielom v distribúcii častíc jednotlivých zložiek sa zvyšuje riziko segregácie práškovej zmesi počas homogenizácie.⁷⁴ Kontrolou a úpravou veľkosti častíc API a pomocných látok je možné segregáčny proces minimalizovať.⁷³ Pri podávaní tabliet *per os* závisí rýchlosť dezintegrácie tablety a disolúcia (rozpúšťanie) účinnej látky v zažívacom trakte od veľkosti častíc a ich porozite.⁷⁴ Zvýšenie špecifického povrchu spôsobuje zníženie

fyzikálnych prekážok rozpúšťania a urýchľuje celý proces absorpcie. Toto je využívané pre úpravu chovania generického prípravku *in vivo*,⁷⁶ pretože generický liek musí byť s originálnym prípravkom bioekvivalentný.

Počas bioekvivalenčnej štúdie (BES) sa preukazuje zhodný koncentračný priebeh účinnej látky v krvi na čase. Limity pre vyhodnotenie zhody sú $\pm 20\%$ na hladine významnosti $P = 0,05$.⁷⁷ Z praktických a ekonomických dôvodov sa BES vykonáva na záver vývoja generického prípravku. Priebežne sa však kontroluje zhoda vykonávaním disolučných testov, porovnávaním zhody disolučných profilov originálu a generického prípravku. Takéto hodnotenie nie je príliš nákladné a je možné ho prevádzať opakovane. Zmenou distribúcie veľkosti častíc generického prípravku je možné upraviť disolučný profil tablet do požadovaného priebehu.⁷³

Vo farmaceutickom priemysle sa na meranie distribúcie veľkosti častíc najčastejšie používajú obrazové analýzy zo svetelného alebo elektrónového mikroskopu (SEM) a laserová difrakcia.⁷⁸ Prehľad rozsahu merania, aplikácie, množstva vzorky zobrazuje Tabuľka 2.7.

Tabuľka 2.7 Vybrané metódy merania veľkosti častíc

Metóda	Optická mikroskopia	Elektrónová mikroskopia SEM	Laserová difrakcia
Množstvo vzorky [g]	<0,1	<0,1	>0,5
Min [μm]	1	0,02	0,02
Max [μm]	1000	1000	2000
Určenie tvaru	áno	áno	nie
Určenie distribúcie	áno	áno	áno
Určenie povrchu	áno	áno	nie
Typ vzorky	suché prášky	suché prášky – predúprava vzorky	prášky dispergované v suspenzii, suché prášky

Častice sa môžu vyskytovať v najrôznejších veľkostiach a takisto sa môžu vyskytovať vo veľkom množstve tvarov. Na popísanie týchto vlastností existuje veľa koeficientov a faktorov, ale žiadny nie je dokonalý, pretože to nie sú ideálne geometrická telesá, zvyčajne sa jedná o tvary nepravidelné. Spôsob, akým sa tvary a veľkosti častíc hodnotia, závisia od účelu merania a od dostupných analytických metód.

Výsledky jednotlivých metód i pri meraní pravidelných sférických častíc sa môžu líšiť až o 10 %.^{73,79} Z tohto dôvodu je porovnávanie výsledkov získaných rôznymi metódami merania nevhodné.^{73,80}

Najjednoduchšie je popísanie veľkosti v prípade gule — je to možné popísať jedným číslom — priemerom. Základné tvary častíc, ktoré popisuje Európsky liekopis sú: ihličky, doštičky, stĺpiky, kvádre, kocky, gule a nepravidelné častice.⁸¹ Pre popis iných tvarov ako guľa jedným číslom, bola do praxe zavedená aproximácia na ekvivalentnú guľu, t. j. guľu o rovnakom objeme, povrchu, rýchlosti sedimentácie ako má reálna častica.^{73,75,78,82}

Nižšie sú stručne charakterizované tri najčastejšie metódy hodnotenia veľkosti a tvaru častíc.

Svetelná mikroskopia je tradičná metóda pre charakterizáciu častíc. Pomerne rýchlo a pri malých navážkach je možné získať informácie o tvare a veľkosti častíc. Porovnateľné výsledky sa získavajú aj z elektrónovej mikroskopie. Tu je však k dispozícii niekoľkonásobne väčšie zväčšenie, veľká hĺbka ostrosti s možnosťou pozorovať častice až na 1 nm a povrch častíc v priestorovom zobrazení.^{73,83}

Elektrónová mikroskopia využíva optický prístroj rovnako ako svetelná mikroskopia, kde ale elektróny nahrádzajú fotóny a elektromagnetické šošovky nahrádzajú sklenené šošovky. Táto metóda je využívaná v prípade, že svetelným mikroskopom nie je možné častice pozorovať (sú nepriehľadné), alebo ako ďalšie doplnujúce meranie k svetelnému mikroskopu. Obrázky, ktoré poskytuje SEM sú bezfarebné v sivej škále. Snímky poskytujú lepšiu hĺbku ostrosti a detailov ako je to pri svetelnom mikroskope. Hraničná rozlišovacia schopnosť je úmerná vlnovej dĺžke použitého žiarenia a keďže elektróny ju majú podstatne kratšiu ako viditeľné svetlo, má aj elektrónový mikroskop oveľa vyššiu rozlišovaciu schopnosť a dosahuje oveľa vyššie efektívne zväčšenie. Rozlíšenie je dôležitejší parameter ako zväčšenie, pokiaľ nie je dostatočná rozlišovacia schopnosť, tak vyššie zväčšenie neposkytuje ďalšie informácie.

Laserová difrakcia je rýchla, robustná a reprodukovateľná metóda, ktorá je stále viac preferovaná na meranie veľkostí častíc v oblasti farmaceutického priemyslu. Princípom metódy je kontinuálny prietok častíc celej vzorky meracou celou, na ktoré dopadá laserový zväzok.^{73,84} Difrakčný obraz poskytuje informácie o veľkosti a tvare častíc a pomocou Fourierovej transformácie sú prevedené na distribučnú krivku.^{26,73} Pred zavedením metódy do rutinného používania je nutné metódu validovať pre daný typ vzorky. Meranie vzorky prebieha v troch krokoch: interakcia s laserovým lúčom a získanie difrakčného obrazu, prevod difrakčného obrazu do digitálneho formátu, prevod digitálneho formátu difrakčného obrazu na distribučnú a kumulatívnu krivku.^{73,85} Výsledky sú bežne uvádzané ako percentilné d-hodnoty.^{73,85,86} Táto metóda neposkytuje priamy obraz častíc, ale difrakčný obraz, a preto je vhodné doplniť výsledok o snímky z mikroskopu.⁷³ Laserová difrakcia umožňuje použité

aproximácie ovplyvniť užívateľom len minimálne. Na základe znalostí o tvare častíc v meranej vzorke je možný výber iba z troch prednastavených možností prepočtu detegovaného signálu na distribučnú krivku. Tým sa znižuje vplyv orientácie častice pri lete meracou celou, napr. bimodálne rozdelenie distribúcie veľkosti ihličkových častíc z dôvodu ich orientácie na laserový lúč. Pre voľbu najvhodnejšieho typu pre vyhodnotenie je potrebné najskôr zistiť tvar častíc mikroskopom. Laserová difrakcia pre výpočet distribúcie častíc používa iba objemy ekvivalentných gúľ.²⁶ V prípade obrazovej analýzy sa objemová distribúcia získava najčastejšie aproximáciou na objem ekvivalentnej gule, výpočtom, ktorý odčítava skutočnú plochu častice, prevádza na kruh s rovnakou plochou a zisťuje jeho priemer. Tento priemer je označovaný ako ekvivalentný priemer a je následne použitý na výpočet objemu ekvivalentnej gule. Relatívna distribúcia častíc predstavuje percentuálne rozdelenie častíc do histogramu na základe dĺžky.²⁶ Kombináciou niekoľkých relatívnych distribúcií ako je minimálny a maximálny priemer je možné častice lepšie charakterizovať.⁸⁷ Takisto je tu možnosť editácie v tabuľkovom editore.

2.3.10 Špecifický povrch častíc

Veľkosť častíc je najčastejšie používaná metóda na hodnotenie vstupných materiálov (API aj excipientov) vo farmácii. Nastavujú sa špecifikačné limity pre vybratie vhodných surovín do formulácie liekov aj vzhľadom na ďalšie skúšky ako je disolúcia. Pre komplexnosť hodnotenia predovšetkým API sa meria plocha špecifického povrchu (SSA). Hoci dodávatelia surovín majú pre ich výrobu zadefinované postupy a špecifikácie, z rôznych dôvodov môže jeden dodať rôznu kvalitu, čo môže mať za následok neočakávané procesy a odchýlky v spracovaní a konečnej kvalite.⁸⁸ Z tohto dôvodu zaradenie merania SSA by malo byť začlenené do hodnotenia kontroly kvality vstupných surovín ako nástroj na zabezpečenie štandardnosti materiálov, ktoré sú potrebné pre výsledné parametre konečného produktu. Zníženie veľkosti častíc z dôvodu použitia viacerých kvalít toho istého vstupného materiálu, alebo viacerých stupňov jeho spracovania, má dopad na zmenu povrchovej plochy materiálu, ktorá narastá s poklesom veľkosti častíc. Toto môže mať priamy dopad na problémy s homogenitou. Táto nepriama úmera medzi veľkosťou častíc a plochou povrchu má dopad na zvýšenie povrchovej energie, čo má za následok destabilizáciu zmesi počas tabletovania. Toto vedie k neefektívnemu miešaniu, tvorbe zhlukov (segregácii), alebo rozvrstvovaniu, čo sú kľúčové dôvody nevyhovujúcich výsledkov miešania a homogenity obsahu.

Je potrebné vyhodnotiť príspevok vstupných materiálov aj procesov a zadefinovať hlavné príčiny problémov s dopadom na čas rozpadu tabliet, problémy miešania surovín, homogenitu

obsahu alebo neočakávané zmeny disolučných profilov. Analýza plochy povrchu je jedným z kľúčových nástrojov na získanie poznatkov od vývoja produktu a vytvárať tak robustné procesy a vyrábať lieky za splnenia požadovaných zaregistrovaných parametrov.

Význam plochy povrchu je v kombinácii s ďalšími vlastnosťami, ako je vhodný výber soli API v súvislosti na rozpustnosť finálneho produktu. Charakterizácia surovín má významný vplyv už počas farmaceutického vývoja. Pochopenie vplyvu kľúčových vlastností substancií a ich správanie počas výrobného procesu má rozhodujúci vplyv na účinnosť lieku.

Účinnosť kľúčových látok sa mení s ich povrchovou plochou a môže spôsobovať problémy počas disolúcie. Ak sa tieto informácie zohľadnia už počas procesu vývoja, môže sa predísť potenciálnemu prepracovaniu procesu, zamietnutiu finálneho produktu, alebo problémom počas životného cyklu výrobku. Povrchová plocha kľúčových surovín môže byť hodnotená ako CQAs v súlade s pokynmi ICH-Q8, čím sa stane jednou z častí celkovej kontroly kvality.

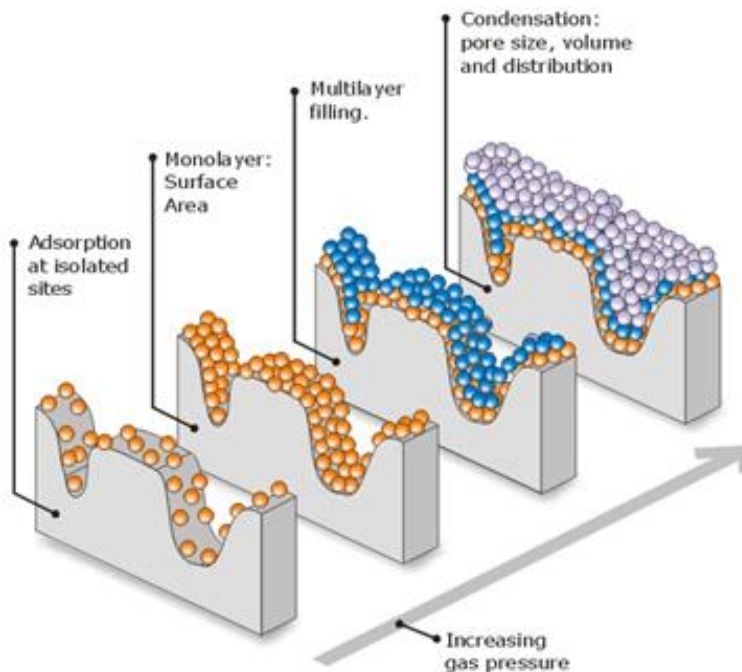
Rýchlosť disolúcie API je ovplyvňovaná aj jeho povrchovou plochou. Zvýšenie povrchovej plochy umožňuje byť v kontakte s disolučným médiom a z toho dôvodu, materiál, ktorého povrchová plocha je vyššia, je rýchlejšia aj jeho disolúcia a následne jeho dostupnosť pre absorpciu je v takom množstve, ktoré môže spôsobiť nepriaznivé farmakodynamické dopady. To môže mať za následok zamietnutie produktu z dôvodu obavy o jeho bezpečnosť.

Jedným z najčastejšie využívaných modelov na určenie plochy povrchu je meranie špecifickej plochy voľného povrchu pevnej látky na molekulárnej úrovni (vrátane rozdelenia veľkosti pórov pomocou metódy BET (Brunauer, Emmett a Teller), ktorému sa budem ďalej venovať. Ďalším prístupom môže byť napr. Langmuirov model.^{89,90}

Meranie plochy povrchu pevných/práškových vzoriek zahŕňa prípravu vzorky s odstránením nečistôt (voda, CO₂), adsorbovaných zo vzduchu, pomocou vákua, zahriatím a prúdom plynu, obvykle N₂ alebo Kr. Následne je vzorka ochladená na -195 °C, pod vákuom a kontrolovaným prídavkom adsorbentu pevnej látky. Po každom prídavku adsorbentu sa nechá dosiahnuť rovnovážny tlak a množstvo adsorbentu sa následne vyhodnocuje. Množstvo adsorbentu pri každej teplote a tlaku poskytuje adsorpčné izotermy, ktoré sa používajú na stanovenie množstva plynu potrebného na vytvorenie monovrstvy na vonkajšom povrchu látky. Je možné stanoviť plochu z oblasti monovrstvy vytvorenú týmito adsorbovanými molekulami plynu vid' Obrázok 2.22. Táto technika vychádza z postupu opísaného v USP <846> na meranie špecifickej povrchovej plochy.

Na záver je dôležité podotknúť, že plocha špecifického povrchu určeného BET analýzou sa vzťahuje na celkovú plochu povrchu (reaktívny povrch), pretože všetky porézne štruktúry

adsorbujú malé molekuly plynu. Povrchová plocha určená BET je teda obvykle väčšia než plocha určená prestupnosťou pre vzduch, ktorá je v Ph.Eur. 2.9.26 Metóda II uvedená ako „Volumetrická metóda“. BET analýza je v súlade s touto metódou^{90,91}.



Obrázok 2.22 Meranie povrchovej plochy^{92,93,94}

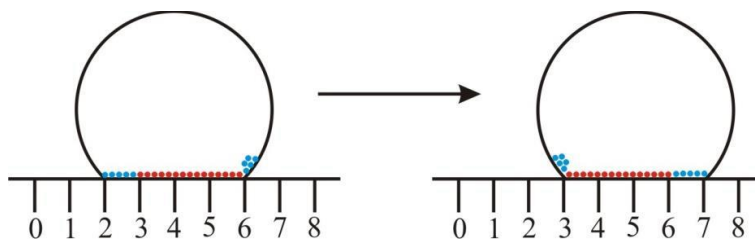
2.3.11 Zmäčavosť a kontaktný uhol

Kontaktný uhol je hlavnou charakteristikou tvaru kvapky kvapaliny na povrchu materiálu a zároveň jedna z mála priamo merateľných vlastností fázového rozhrania. V prípade, že sa jedná o homogénny pevný povrch, kontaktný uhol kvapky vody je nezávislý na jej objeme.^{95,96}

Povrchovo–aktívne látky sú látky, ktoré sa budú adsorbovať na rozhraní vzduch–voda alebo olej–voda a povrchu pevnej látky. Štruktúrne vlastnosti týchto molekúl sú zodpovedné za ich povrchovú aktivitu. Štúdium adsorpčných procesov je dôležitým základom pre pochopenie vlastností povrchovo aktívnych látok. Medzipovrchová voľná energia a povrchové napätie jednotlivých zložiek v dôsledku adsorpcie rozhoduje o ich schopnosti vytvárať emulzie alebo suspendovať.⁹⁷ Tieto dva procesy majú významný vplyv na povrchovú aktivitu vodných roztokov.

V širokom rozsahu aplikácii je zmáčavosť a znalosť princípov vzájomnej interakcie rozpúšťadiel s povrchmi rozhodujúca.

Pohyb kvapky po horizontálnom povrchu, smerom z východiskovej do konečnej kontaktnej plochy, môže byť spôsobený pohybom povrchu, vibráciami alebo prúdením vzduchu o stopercentnej vlhkosti. Popísaný jav znázorňuje Obrázok 2.23.⁹⁸



Obrázok 2.23 Znáznornenie pohybu kvapky vody, červené krúžky reprezentujú molekuly vody, ktoré zostávajú počas procesu v pokoji⁹⁸

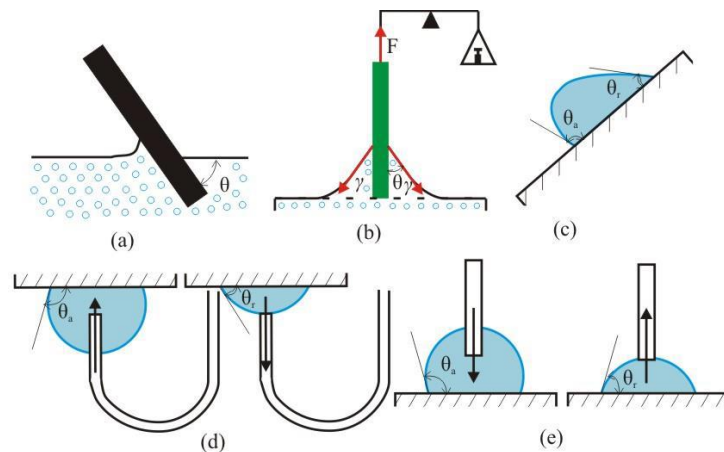
Červené krúžky, ktoré uvádza Obrázok 2.23 medzi polohami 3 a 6 predstavujú molekuly, ktoré sa nehýbu spolu s kvapkou. Pri protisklzových podmienkach, pohybujúce sa medzifázové molekuly vody eliminujú zmáčanie doposiaľ zmáčaného povrchu a zmáčajú novú časť povrchu. Tvoria ich len molekuly nachádzajúce sa v rozmedzí približne 0,5 nm od trojfázového rozhrania. Hysteréziu teda ovplyvňuje štruktúra a stabilita trojfázového rozhrania a procesy odohrávajúce sa na fázovom rozhraní medzi kvapalinou a povrchom.⁹⁸ Samoorganizujúce sa monomolekulové vrstvy umožňujú zvýšenú kontrolu nad povrchovými vlastnosťami. Avšak väčšina štúdií venovaná zmáčavosti sa zaoberá menej relevantnými rozpúšťadlami ako sú voda, dijódometán, hexadekán.⁹⁹

Meranie uhla zmáčavosti je častokrát využívané na charakterizáciu materiálov, stanovenie účinkov kvapaliny na povrch. Kontaktný uhol kvapky kvapaliny nanesej na pevnom povrchu odráža schopnosť kvapaliny sekundárne interagovať s povrchom.^{100,101}

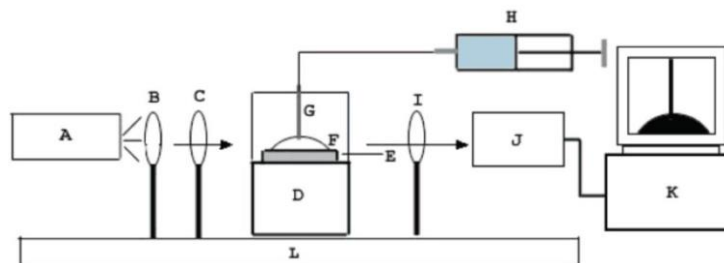
Pre samotné meranie kontaktného uhla bolo vypracovaných niekoľko metód. Najbežnejšími sú meranie uhla medzi naklonenou platničkou vyrobenou z vyhodnocovaného materiálu a vodorovným povrchom, Wilhelмова technika vyvažovania dosky, meranie pomocou naklonenej dosky, metóda zachytenej bubliny, metóda sediacej kvapky vid' Obrázok 2.24.^{100,102}

Metóda sediacej kvapky je priamym meraním kontaktného uhla Obrázok 2.25. Kvapka kvapaliny sa mikrostriekačkou alebo mikropipetou umiestni na rovinný povrch tuhej látky, osvetľovaný zväzkom lúčov. Uhol je potom meraný buď priamo mikroskopom s goniometrickou stupnicou, alebo je profil kvapky snímaný kamerou a vyhodnocovaný počítačom. Hysterézia kontaktného uhla je stanovovaná, podobne, ako v prípade vzduchovej bubliny, zväčšovaním a znižovaním objemu kvapky pohybom medzifázového rozhrania. Počas procesu zmeny objemu je veľmi dôležité vyhnúť sa vibráciám a skresleniu kvapky.^{100,102}

K hodnote kontaktného uhla v prípade vysoko poréznych materiálov v procese zmáčania prispievajú kapilárne javy. V kapiláre je pri zakrivenom menisku tlakový rozdiel, na konvexnej strane je nižší tlak ako na konkávnej. Kvapka kvapaliny, ktorá je v rovnováhe s okolitou atmosférou, má vyšší tlak ako kvapalina uzatvorená v póroch. Práve tento proces je hnacou silou pre penetráciu kapiláry a postup kvapaliny hlbšie do pórov. Tvar pórov má takisto vplyv na daný efekt.¹⁰²



Obrázok 2.24 Techniky merania kontaktného uhla: (a) metóda nakláňania dosky (b) Wilhelмова metóda (c) meranie hysterezie pomocou naklonenej dosky (d) metóda zachytenej bubliny (e) metóda sediacej kvapky^{100,102}



Obrázok 2.25 Schéma aparatury pre meranie kontaktného uhla pomocou sediacej kvapky: A svetelný zdroj, B,C šošovky, D termostatická komora, E vzorka, F kvapka, G kapilára, H striekačka, I šošovka, J kamera, K počítač, L podstava odolná voči vibráciám¹⁰³

Pri popise povrchov sú používané termíny hydrofilnosť a hydrofóbnosť. Ak je povrch hydrofilný, má tendenciu vodu adsorbovať — je zmáčaný vodou. Naopak, hydrofóbný povrch nemá snahu vodu adsorbovať — vodou zmáčaný nie je.¹⁰⁴ Hydrofóbnosť/hydrofilnosť závisí na interakciách vody a povrchu a na kohéznych silách vody. Kvantitatívnou metódou pre stanovenie relatívneho stupňa týchto interakcií je meranie kontaktného uhla kvapky vody na pevnom povrchu. Ak je kontaktný uhol menší ako 30° , materiál je posudzovaný ako hydrofilný. Ak sa kvapka vody na povrchu rozostiera a uhol zmáčania je menší ako 10° , daný materiál je považovaný za superhydrofilný. Na druhej strane, hydrofóbné sú látky

s kontaktným uhlom väčším ako 90° . Teoretické maximum uhla zmáčania hladkých povrchov je 120° . Niektoré drsné povrchy s mikrotextúrou môžu prekročiť hranicu 150° a pripisujú sa im superhydrofóbne vlastnosti.¹⁰⁴

2.3.12 Röntgenová difrakcia

Röntgenová difrakcia (RTG) je jednou zo základných pevnofázových analytických techník s možnosťou identifikácie charakterizácie látok a ich rozlíšenia.^{26,105} RTG má svoje uplatnenie aj pri vývoji generických liekov, pri štruktúrnej charakterizácii nečistôt, medziproduktov, alebo aj pri patentových sporoch, vo farmaceutickej dokumentácii.¹⁰⁶ Je založená na schopnosti pevných látok rozptyľovať fotóny röntgenového žiarenia a vytvárať tak difrakčný obraz, ktorý charakterizuje vnútornú štruktúru látky. Teória RTG difrakcie vychádza zo znalostí kryštalografie.²⁶ Táto metóda má svoje zastúpenie aj vo farmaceutickom priemysle, nakoľko je požadovaná Európskym liekopisom⁵⁹ ako štandardná kontrola polymorfnej modifikácie API. Je to nástroj na mapovanie polymorfizmu, pre určenie chiralít API a pre splnenie požiadaviek autorít.¹⁰⁶ Takisto aj smernice ICH Q6A a smernice FDA uvádzajú RTG práškovú difrakciu ako základnú analytickú metódu na rozlíšenie rôznych kryštalických štruktúr — polymorfov.^{26,107} Polymorfizmus je vlastnosť chemických molekúl kryštalizovať vo viacerých kryštalových modifikáciách — polymorfoch, ktoré sa vo svojich vlastnostiach niekedy výrazne líšia. Vo farmácii je to hlavne v rýchlosti rozpúšťania. Je to vo všeobecnosti veľmi rozšírený jav, a ak je to možné originálne firmy si vyberajú najstabilnejšiu formu kvôli vylúčeniu nežiaducich polymorfných prechodov. Naopak pre generické firmy je výber nestabilných polymorfov cesta, ako sa vyhnúť patentovej kolízii s originátorom.¹⁰⁶

Všeobecne je možné predpokladať, že rôzne fyzikálne a chemické vlastnosti kryštalických látok sú odrazom rôzneho vnútorného usporiadania molekúl v kryštáli.

Pre monitorovanie polymorfného systému sa vo farmácii najčastejšie používa prášková difrakcia „Powder X-Ray Diffraction“ (PXRD). Rozdielny PXRD záznam, dvoch a viac fáz rovnakej chemickej molekuly veľmi pravdepodobne indikujú polymorfizmus. Okrem polymorfizmu API je potrebné zohľadniť aj možný polymorfizmus pomocných látok.¹⁰⁶

Röntgenová difrakcia je analytická metóda nedeštruktívna, rýchla a umožňuje identifikáciu kryštalických materiálov, rozlišovať medzi rôznymi solvátmi alebo soľami jednej API, poskytuje informácie o kryštalovej štruktúre a vzdialenostiach medzi jednotlivými atómami.¹⁰⁸

RTG žiarenie má schopnosť prechádzať nepriehľadnými materiálmi a po ich prechode k energetickému úbytku. Pri dopade RTG žiarenia na kryštalovú štruktúru sa jednotlivé atómy,

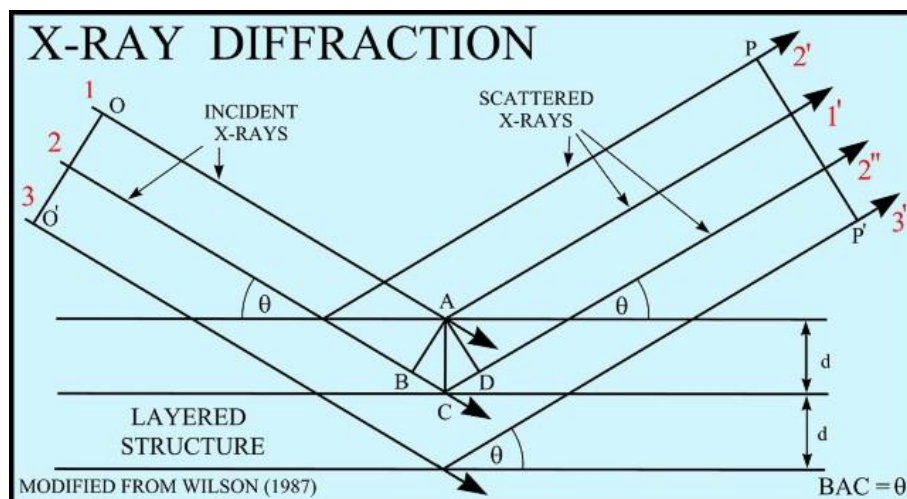
ktoré ju vytvárajú sami stávajú zdrojom RTG žiarenia s rovnakou vlnovou dĺžkou. Lúče, ktoré takto vznikajú, navzájom interferujú a výsledkom sú difraktované lúče, ktorých smer je odlišný od smeru lúča dopadajúceho. Difrakcia je odraz RTG lúčov na rovinách kryštálovej mriežky.¹⁰⁵

RTG žiarenie vzniká tromi spôsobmi: dopadom urýchleného elektrónu na pevnú podložku (RTG lampy — röntgenka), zmenou dráhy relativistického elektrónu — synchrotronové žiarenie a ako vybudené fluorescenčné žiarenie (príliš malá intenzita pre praktické použitie).²⁶ Laboratórnym zdrojom žiarenia je röntgenka, žiarenie vzniká prudkým zabrzdением veľmi rýchlo letiacich elektrónov o hmotu vysokej hmotnosti, zariadenia na stabilizáciu elektrického prúdu a elektrického napätia. Stabilita prúdu, ktorý žeraví vlákno v RTG lampe ako aj napätie, ktoré uvoľnené elektróny urýchľuje je jednou z najdôležitejších podmienok získania správneho a reprodukovateľného záznamu. Ďalšou významnou časťou zariadenia je goniometer, nazývaný tiež difraktometer. Vzorka sa vloží do goniometra, v ktorom sa otáča okolo osi goniometra. Tu na ňu dopadá RTG žiarenie vychádzajúce z RTG lampy, ktoré diverguje v horizontálnom aj vertikálnom smere. Je potrebné použiť sadu clôn, ktoré toto žiarenie ohraničujú, kontrolujú a usmerňujú. Skôr ako difraktované žiarenie prejde do detektora prechádza monochromátorom. Difraktované žiarenie je detektorom registrované v podobe pulzov, ktoré sú elektricky upravené a následne zaznamenané.^{26,105} Po dopade RTG lúča na kryštalovú mriežku každá rovina rozptýli len malé množstvo žiarenia, výsledný rozptyl od veľkého počtu rovín však poskytuje dostatočnú intenzitu pre pozorovanie. Pretože každý kryštalický materiál má charakteristickú atómovú štruktúru, bude difrakcia RTG lúčov jedinečná. Ak žiarenie dopadá na dve paralelné roviny vzdialené o d , zväzok rovnobežných RTG lúčov pod uhlom dopadu θ , detegujeme interferenčné maximum difraktovaných lúčov v prípade, že ich dráhový rozdiel sa rovná celému násobku vlnovej dĺžky dopadajúceho žiarenia. vid' Obrázok 2.26.^{26,109}

Dráhový rozdiel lúčov 1' a 2' sa rovná $2d\sin\theta$, kde uhol θ je uhol, ktorý zvierajú dopadajúci lúč s rovinou kryštálu. Podmienka pre vznik difrakčných maxim lúčov 1' a 2' je daná vzorcom:

$$2d\sin\theta = n\lambda \quad n = 1, 2, 3 \dots$$

Tento vzťah je Braggova rovnica. Pri znalosti vlnovej dĺžky λ a ak zmeriame uhol θ , môžeme určiť vzdialenosti d kryštalových rovín. Toto je princípom celej vednej disciplíny — röntgenovej štruktúrnej analýzy.^{26,110} Podľa typu meranej vzorky rozlišujeme dve základné meracie metódy: difrakcia na monokryštále „X-Ray Diffraction“ (XRD) a práškovú difrakciu „(P)XRD“. Ich porovnanie uvádza Tabuľka 2.8.



Obrázok 2.26 Znárodnenie difrakcie na kryštálovej štruktúre.¹¹¹

Limitujúcim faktorom je kvalita vstupného materiálu, dostatočná veľkosť monokryštálu a jeho stabilita. Vo farmaceutickej výrobe je vstupný materiál vo forme prášku (získanie jeho monokryštálu môže byť aj problematické), preto sa častejšie používa PXRD.¹⁰⁶ Prášková difrakcia je v súčasnej dobe považovaná za štandardnú metódu. V prípade, že sú k dispozícii dostatočne kvalitné dáta z laboratórných RTG prístrojov, nie je problémom väčšinu jednoduchých kryštálových štruktúr vyriešiť na základe známeho modelu molekuly.¹⁰⁶ Limitom sa však stáva zložitosť výpočtu a nie kvalita experimentálnych údajov.¹¹² Priame metódy sa v praxi dajú použiť iba na jednoduché systémy — zložitejšie zadania je potrebné riešiť vyhľadávaním správnych parametrov modelov. Pokiaľ vzorka poskytuje dostatočne kvalitný záznam PXRD, vyskytujú sa v ňom mikromonokryštály a sú vhodné pre úplné riešenie štruktúry.

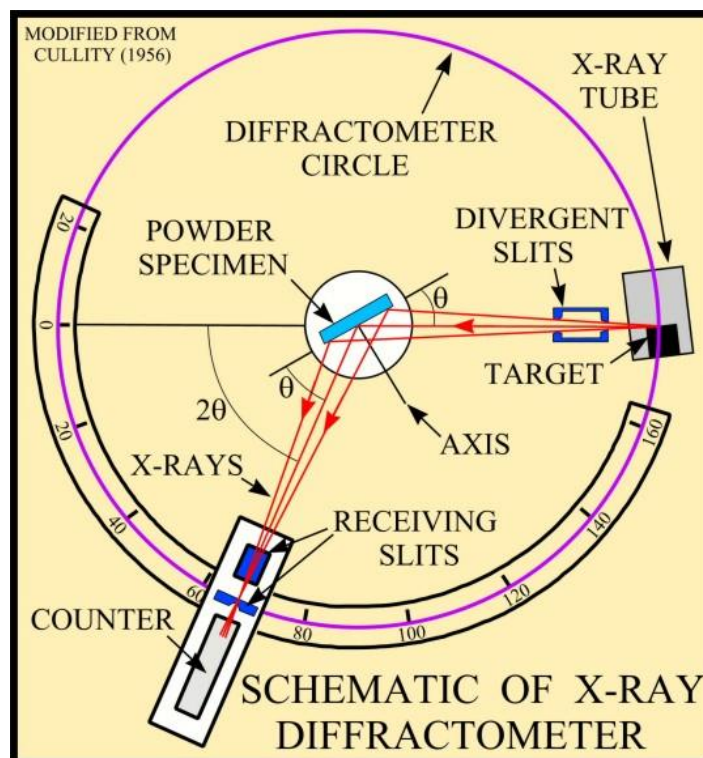
Meranie a spracovanie vzoriek

Každý kryštálik predstavuje monokryštál, ktorý je vo vzorke rozložený úplne náhodne. Polykryštálická vzorka môže byť sypká, môže to byť zlisovaný prášok, alebo kompaktné teleso — s navzájom spojenými kryštálikmi. Metódy používané na meranie difrakcie RTG lúčov sú Debyeova-Scherrerova metóda, Braggovo-Brentanovo parafokusačné usporiadanie. Presné určenie uhlovej polohy difrakčnej línie umožňujú difraktogramy určené na skúmanie polykryštálických materiálov. Obrázok 2.27 zobrazuje schému najbežnejšieho typu difraktometra.

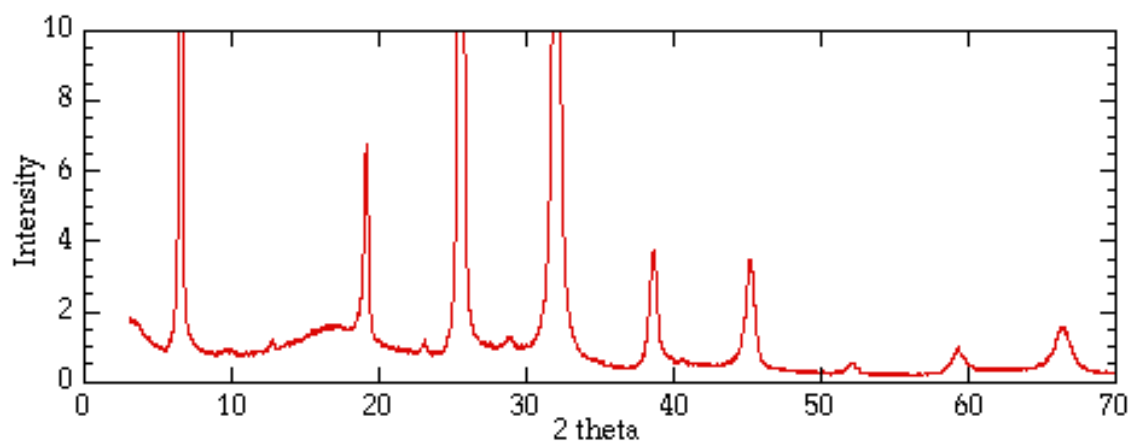
Tabuľka 2.8 Porovnanie meracích RTG metód²⁶

Názov	RTG prášková difrakcia	RTG difrakcia na monokryštále
označenie	PXRD	Single XRD
typ vzorky	prášok	monokryštál
množstvo vzorky	100 — 500 mg	jeden monokryštál o veľkosti 0,1 — 1 mm
úprava vzorky	naplnenie kavítu držiaču, alebo mletie, rozotretie v achátovej miske	fixácia na goniometrickú hlavičku vybratý vhodný monokryštál
spotreba vzorky	nedeštruktívna	nedeštruktívna
doba merania	minúty/hodiny	hodiny/dni
princíp metódy	na polykryštalický materiál dopadá monochromatické žiarenie a difraktujú všetky mriežky spĺňajúce podmienku difrakcie súčasne	monochromatické žiarenie dopadá na monokryštál, a pretože difraktuje len jediná mriežka, je nutné kryštálom otáčať, aby sme získali požadovanú sadu reflexií (princíp štvorkruhového difraktometra)
pozície reflexie	1 uhol (2θ)	3 pozičné uhly
analýza získaných dát	„odtlačok palca (Fingerprint)“ kryštálovej štruktúry	kompletné informácie o molekule, konformácii, väzbových vzdialenostiach, chiralite, priestorovom usporiadaní molekúl v kryštále, interakciách medzi molekulami, umiestnení a určenie solventu
využitie v praxi	hlavne v priemysle, screeningová a kontrolná metóda pre charakterizáciu kryštalického materiálu	kryštalografické štúdie: určenie kompletnej štruktúry API, proteínu, komplexu, apod.

Počas merania sa vzorka otáča uhlovou rýchlosťou θ a detektor uhlovou rýchlosťou 2θ . Pozičný uhol detektora je počas merania zaznamenávaný a pokiaľ počas merania nastane na ľubovoľnej štruktúrnej rovine vo vzorke k splneniu Braggovej rovnice, detektor zaznamená zvýšenie intenzity difraktovaného lúča. Výsledkom je difraktogram — graf, kde na os x je zaznamenávaná poloha detektora v stupňoch 2θ a na ose y je intenzita difraktovaného žiarenia zaznamenaná detektorom, viď Obrázok 2.28. Vyhodnocuje sa v grafickej forme s relatívnymi intenzitami (vzhľadom na maximálnu líniu), a jeho ďalším doplnkom je tabuľka pozícií pík (2θ) a ich relatívnych intenzít (I_{rel}), prípadne hodnota d medzirovinných vzdialeností. Ak sa záznam porovnáva so štandardom toto porovnanie je iba vizuálne, nie je tu možné porovnanie algoritmom ako napr. pri porovnaní FT-IR dát.^{26,113}



Obrázok 2.27 Schéma difraktometra¹¹⁴



Obrázok 2.28 Difraktogram¹¹⁵

2.3.13 Disolúcia

Disolúcia je skúška, ktorou sa stanovuje množstvo uvoľnenej API z pevnej liekovej formy ako sú tablety, tobolky, čapíky, v predpísanej kvapaline a za predpísaný čas.⁵⁹ Pre finálnu kontrolu liekov je jednou z dôležitých metód hodnotenia metóda disolúcie. Je základnou metódou popísanou aj v liekopisoch: Ph.Eur. kapitola 2.9.3,⁵⁹ USP Dissolution <711>,¹¹⁶ takisto sa tejto metóde venuje aj smernica ICH Q4B Annex 7(R2).¹¹⁷

Pre účinnú molekulu — API vo farmácii znamená „byť aktívna“, dostať sa na miesto účinku v tele. Najčastejšie sú vo forme tabliet pozostávajúce z práškových zložiek rôznej veľkosti

častíc. Takáto molekula v prášku či už vo forme kryštálu alebo v amorfnej forme nie je priamo biologicky dostupná a častice sa v tele neabsorbujú. Aby takáto častica mohla byť absorbovaná, musí sa rozpustiť, to znamená, absorpcia molekúl prebehne iba v prípade, že sú jednotlivé molekuly účinnej látky obklopené vodou.

Rozpúšťanie lieku a následne uvoľňovanie pre orálne dávkované formy prebieha obvykle v žalúdku zatiaľ čo absorpcia prebieha v tenkom čreve. Žalúdočné pH je pomerne nízke, pohybuje sa od 1,5 — 3, závisí od individuálneho jedinca, to znamená, že počiatočné rozpúšťanie prebieha vo veľmi kyslom prostredí. Veľa farmaceutických produktov sa vyskytuje vo forme kyselín alebo báz a to znamená, že rozpúšťanie je veľmi závislé na pH a práve pH hrá veľkú úlohu aj pre biologickú dostupnosť.¹¹⁸

Podľa Biofarmaceutického klasifikačného systému sa liečivá triedia do štyroch skupín na základe ich rozpustnosti a permeability. Tento systém vytvoril teoretický základ pre vyjadrenie korelácie *in vitro* disolučných profilov s *in vivo* biodostupnosťou liečiv. Liečivo je vysoko rozpustné ak jeho najvyššia podávaná dávka sa rozpustí v 250 ml média v rozmedzí fyziologického pH 1,0 — 7,5. Tento rozsah pH modeluje celý gastrointestinálny trakt. Liečivo je vysoko permeabilné ak je absorbované množstvo z roztoku väčšie ako 90 %.¹¹⁹

Veľa liekov je vo formulácii okamžite sa uvoľňujúcich „Immediate Release“, ktoré sa rozpúšťajú v žalúdku a prvým krokom pre vyhodnotenie biologickej dostupnosti je rozpustnosť pri žalúdočnom pH; ak je látka rozpustná v kyslom prostredí, nasleduje hodnotenie rizika vyzrážania v tenkom čreve, ktoré je miestom absorpcie. Sú látky vysoko rozpustné nemajúce tendenciu k zrážaniu, ale sú aj látky, ktoré môžu mať nižšiu rozpustnosť v neutrálnej oblasti pH a to indikuje, že pri prechode do čreva môže nastať vyzrážanie. Vo vzťahu rozpustnosť/disolúcia účinnej látky z hľadiska jej biologickej dostupnosti sa hodnotí:

- stanovenie disolúcie/rozpustnosti pri rôznych pH
- stanovenie veľkosti častíc (veľkosť častíc má veľký vplyv na rýchlosť disolúcie)
- stanovenie rizika vzniku zrazenín

Fyzikálne vlastnosti API — veľkosť častíc, tvar kryštálov, polymorfia, špecifický povrch a ďalšie majú vplyv na disolučnú rýchlosť. No vplývajú na ňu aj vonkajšie podmienky ako tlak pri lisovaní, teplota, pH prostredia, zloženie disolučného média, iónová sila, kapacita tlmivého roztoku.

Skôr ako je účinná látka z lieku dostupná musí sa najskôr uvoľniť z liekovej formy a rozpustiť. Podľa typu liekovej formy sa jedná o deje nasledujúce po sebe: dezintegráciu (rozpad liekovej formy na menšie zhluky častíc — agregáty), dezagregácia (rozpad agregátov na častice nerozpusteného liečiva), disolúcia (rozpúšťanie pevných častíc účinnej látky

v tráviacej šťave). Disolúcia prebieha v dvoch stupňoch. Najskôr dochádza k uvoľňovaniu API z povrchu pevnej liekovej formy do bezprostredného prostredia disolučného média. Vytvára sa nasýtená vrstva — difúzna vrstva, ktoré obklopuje povrch lieku. Nasleduje druhý stupeň, kedy API difunduje do celého objemu roztoku na základe koncentračného gradientu. Rýchlosť rozpúšťania vyjadruje Noyesova–Whitneyova rovnica:

$$\frac{D_x}{dt} = \frac{A \times D}{\delta} \times C_s - \left(\frac{X_d}{V}\right)$$

D_x/d_t – rýchlosť rozpúšťania,

A – plocha povrchu rozpúšťanej liekovej formy,

D – difúzny koeficient,

δ – šírka difúznej vrstvy, ktorá obklopuje liekovú formu,

C_s – saturačná (rovnovážna) rozpustnosť účinnej látky v mg/ml,

X_d – množstvo rozpúšťanej látky v čase t a v objeme V disolučného média.

Na základe vyššie uvedenej rovnice by akákoľvek zmena povahy disolučného média, ktorá zvýši rozpustnosť API mala teoreticky mať za následok vyššiu rýchlosť rozpúšťania. Ak je rýchlosť rozpúšťania $API < 1$, je potrebné zvoliť disolučné médium podobné podmienkam v gastrointestinálnom trakte, aby sa dosiahla zodpovedajúca korelácia *in vitro* — *in vivo*.^{119,120}

Rýchlosť rozpúšťania okrem fyzikálno-chemických vlastností skúšanej API ovplyvňuje aj skutočné fyziologické podmienky v gastrointestinálnom trakte, ktoré sú pre jednotlivých pacientov odlišné (produkcia žalúdočnej kyseliny, stav nalačno, po jedle...). Tabuľka 2.9 uvádza fyzikálno–chemické a fyziologické parametre, ktoré ovplyvňujú disolúciu liečiva v gastrointestinálnom trakte.^{121,122}

Tabuľka 2.9 Fyzikálno-chemické a fyziologické parametre, ktoré ovplyvňujú disolúciu liečiva v gastrointestinálnom trakte

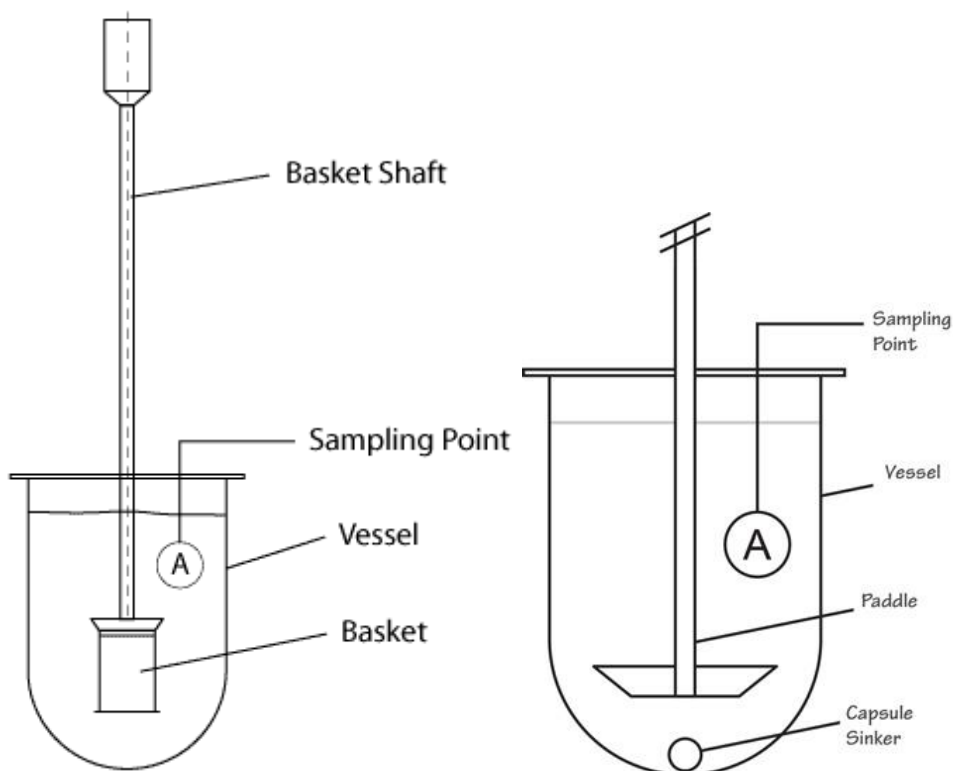
Parameter	Fyzikálno-chemický	Fyziologický
Plocha povrchu lieku (A)	Veľkosť častíc, zmáčavosť	Surfaktanty v žalúdočnej šťave a žlči
Difúzny koeficient lieku (D)	Molekulová veľkosť	Viskozita lumenálneho obsahu
Šírka difúznej vrstvy (δ)		Druh motility, rýchlosť prietoku
Rozpustnosť účinnej látky (C_s)	Hydrofilnosť, kryštalové usporiadanie, solubilizácia	pH, kapacita pufrov, žlč a zloženie stravy
Množstvo rozpusteného lieku (X_d)		Permeabilita
Objem rozpúšťadla (V)		Sekrécia, podávané tekutiny

Každý liek, pre ktorý je požadovaná skúška disolúcie, má predpísaný typ prístroja, na ktorom bude analýza vykonávaná. Pre rutinné hodnotenie sa používajú dva typy prístrojov, košíkový — typ 1 a pádlový — typ 2 (počas vývoja lieku sa často používajú aj ďalšie typy prístrojov, napr. cylindrický alebo s prietokovou celou). Rovnako sú predpísané podmienky analýzy, ako zloženie, objem a teplota disolučného média, čas, spôsob a množstvo odobratého roztoku na stanovenie obsahu API, prípadne podmienky pre automatické vyhodnocovanie, hodnotenie disolúcie prípravku v predpísanom čase.

Všetky časti prístroja, ktoré sú v priamom kontakte s disolučnou kvapalinou alebo liekom sú chemicky inertné, aby sa vylúčila interferencia počas merania. Všetky kovové časti prístroja sú z nerezovej ocele alebo chránené vhodným inertným materiálom. Žiadna časť prístroja alebo jeho príslušenstva nesmie vykazovať vibrácie, výkyvy rotácie hnacieho hriadeľa. Toto sa overuje v pravidelných intervaloch kvalifikácie zariadenia. Vodný kúpeľ počas celej doby trvania disolúcie zabezpečuje teplotu disolučného média $37 \pm 0,05$ °C. Pre obidva najčastejšie používané typy na rutinné hodnotenie sú predpísané presné rozmery a tvar disolučnej nádoby, ktorá býva z borosilikátového skla alebo iného inertného priehľadného materiálu, nádoba má veko na zabránenie odparovania, v ktorom je otvor pre stredový hriadeľ otvor pre odber a prídavok disolučného média, teplotnú sondu. Disolučné zariadenie typu 1 — hriadeľ je na konci zakončený valcovitým košíkom, do ktorého sa vkladá analyzovaná vzorka. Upevnenie košíka k prírubu hriadeľa musí byť natoľko pevné aby nedochádzalo k jeho vychýleniu od stredovej osi nádoby. Tubus košíka je tvorený sieťkou, predpísaných rozmerov, valcovitého tvaru zasadeného do úzkych kovových prstencov. Dno košíka je umiestnené 25 ± 2 mm odo dna nádoby počas celej skúšky. Disolučné zariadenie typu 2 — lopatky hriadeľa prechádzajú presne spodným koncom hriadeľa, ktorý je vystredený a s maximálnou povolenou výchylkou 2,0 mm od stredovej osi nádoby a jej spodný koniec je umiestnený vo vzdialenosti 25 ± 2 mm odo dna nádoby počas celej skúšky. Schéma odberového miesta pre disolučné zariadenia typu 1 a typu 2 vid' Obrázok 2.29.

Počas stanovenia pre miešadlový a košíkový typ sa odoberá v predpísanom čase, alebo časových intervaloch predpísané množstvo roztoku z nádoby v strede medzi hladinou disolučného média a hornou hranou lopatky miešadla alebo košíka a to minimálne 10 mm od steny nádoby. Pri opakovanom odbere sa v prípade typu 1 a 2 nahrádza rovnakým objemom disolučného média, alebo sa počíta s jej úbytkom. Pri automatickom vyhodnotení a priamom spojení so spektrofotometrom sa disolučné médium po meraní v prietokovej kyvete vracia späť do nádoby. Pred samotným meraním sa vzorka filtruje cez vhodný inertný filter. Vyhodnocuje

sa množstvo uvoľnenej účinnej látky v percentách v predpísanom čase vzhľadom na deklarované množstvo.^{59,123}



Obrázok 2.29 Schéma odberového miesta pre disolučné zariadenie typu 1 a 2^{124,125}

Počas vývoja a formulácie zloženia lieku sa využíva skúška disolúcie substance — pravá disolúcia „Intrinsic Dissolution“, ktorej cieľom je stanoviť rýchlosť disolúcie čistej API alebo jej zmesi s pomocnými látkami. Teoretická pravá disolúcia je disolúcia chemicky čistej tuhej látky s nulovou porozitou. V reálnych podmienkach sa vykonáva na vzorke čistej API, alebo zmesi API, ktoré majú nenulovú porozitu aj keď je minimalizovaná kompaktovaním — lisovaním tablety. Rýchlosť pravej disolúcie dm/dt je vyjadrená ako hmotnosť API rozpúšťanej za jednotku času z jednotkového povrchu ($\text{mg}/\text{min} \cdot \text{cm}^2$):¹²⁰

$$dm/dt = VdC/dt = -kA(S - C)$$

S – rozpustnosť API

A – povrch, z ktorého sa API uvoľňuje

m – hmotnosť testovanej vzorky

k – rýchlosť pravej disolúcie

C – koncentrácia v čase t

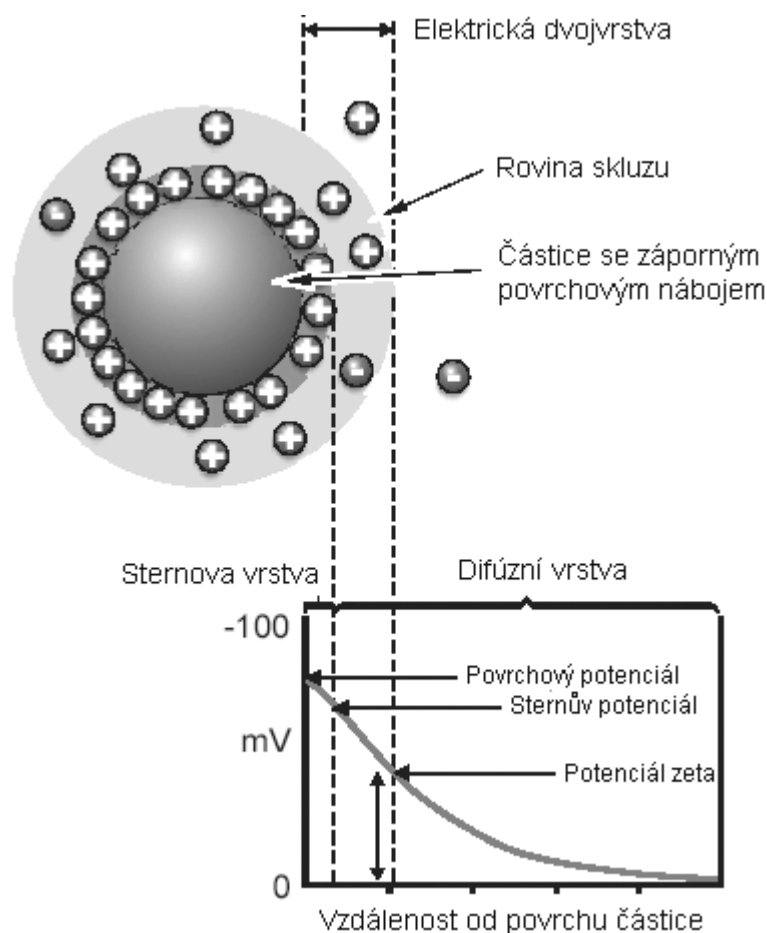
Zdanlivá disolúcia „Apparent Dissolution“ je metóda na testovanie substancií, práškových zmesí a granulovaných práškov. Na tento účel sa používa prietoková disolučná metóda a disolučné zariadenie typ 4. Systém s prietokovou celou je používaný takisto pre prípravky s predĺženou dobou uvoľňovania, alebo pre prípravky s ťažko rozpustnou API. Výhody tejto metódy sú jednoduchá zmena pH, odstránenie problémov práškových vzoriek v zariadeniach typu 1 a 2 (plávanie v disolučnej nádobe, prilepenie k hriadeľu), okamžitá zmáčavosť testovaných práškových vzoriek, vylepšená alternatíva pravej (intrinsic) disolúcie, možnosť porovnávania rôznych disolučných rýchlostí ako kinetická rýchlosť čistých substancií.¹²⁶

2.3.14 Zeta potenciál

Zeta potenciál ζ je potenciál na hranici povrchu/roviny hydrodynamického šmyku. Je to potenciál častice sledovaný na základe elektrokinetických javov. Schematicky to približuje Obrázok 2.30. Na povrchu častíc vzniká sieťový náboj, ktorý ovplyvňuje distribúciu iónov v okolitej oblasti, čo má za následok zvýšenú koncentráciu iónov s opačným nábojom ako má častica v najbližšom okolí. Okolo každej častice teda existuje elektrická dvojvrstva. Kvapalina, ktorá obklopuje časticu má dve časti vnútornú vrstvu — Sternova vrstva, so silne viazanými iónmi a vonkajšiu — difúznou oblasť, kde je viazanie iónov menej pevné. Vo vnútri difúznej vrstvy existuje teoretická hranica, v ktorej ióny a častica tvoria stabilnú jednotku. Pri pohybe častice, napr. z dôvodu gravitácie, ióny vo vnútri hranice sa pohybujú s ňou, ale všetky ióny za hranicou sa s časticou nepohybujú. Práve toto je povrch/rovina hydrodynamického šmyku.¹²⁷

Veľkosť zeta potenciálu naznačuje potenciálnu stabilitu koloidného systému. Koloidný systém vzniká vtedy, keď jedno z troch skupenstiev plynného, kvapalného a pevného, sú jemne dispergované v jednom zo skupenstiev. Táto technika tak sleduje dve skupenstvá: pevná látka dispergovaná v kvapaline — suspenzia a kvapalná látka dispergovaná v kvapaline — emulzia.

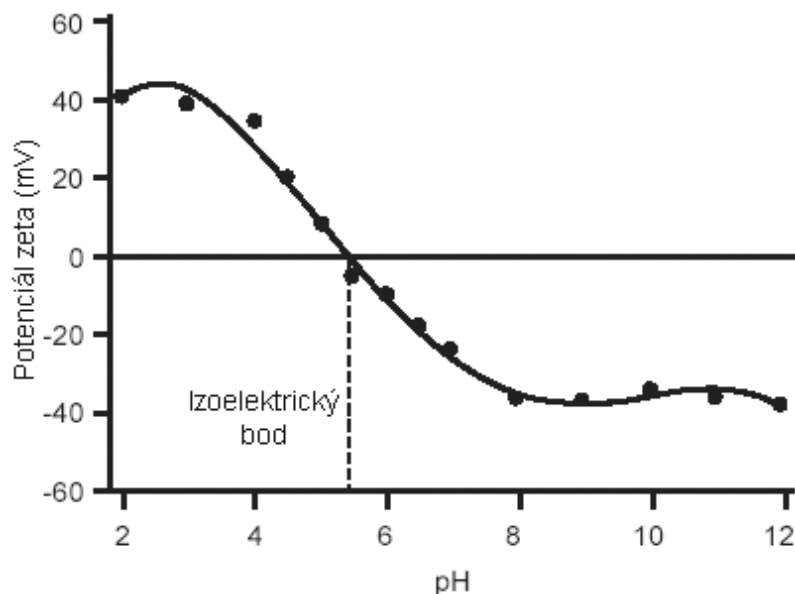
Ak všetky častice v suspenzii majú veľký záporný alebo kladný zeta potenciál, tak budú náchylné k vzájomnému odpudzovaniu sa a nemajú sklon k tomu aby vložkovali (flokulovali). Ak však častice v suspenzii majú nízke hodnoty zeta potenciálu, potom neexistuje žiadna sila k tomu, aby zabránila časticiam sa zhlukovať a flokulovať. Všeobecne rozdiel medzi stabilnou a nestabilnou suspenziou sa považuje buď +30 mV alebo -30 mV. Častice s potenciálom kladnejším než +30 mV, alebo zápornejším než -30 mV sa normálne považujú za stabilné.



Obrázok 2.30 Popis zeta potenciálu a elektrickej dvojvrstvy¹²⁸

Najdôležitejší faktor, ktorý ovplyvňuje zeta potenciál je pH. Ak sa však k tejto suspenzii pridá viac zásady, tak častice budú inklinovať k tomu, aby získavali zápornejší náboj. Ak sa tejto suspenzii pridáva kyselina, dosiahne sa bod, kde sa záporný náboj neutralizuje. Akékoľvek ďalšie pridávanie kyseliny môže spôsobiť vytváranie kladného náboja. Preto krivka zeta potenciálu vzhľadom k pH bude kladná pri nízkom pH, a nižšia alebo záporná pri vysokom pH. Bod, kde závislosť prechádza nulovým zeta potenciálom, sa nazýva izoelektrický bod a z praktických dôvodov je veľmi dôležitý. Normálne je to bod, kde je koloidný systém najmenej stabilný. Typické vynesenie zeta potenciálu vzhľadom k pH uvádza Obrázok 2.31.

Tradičné elektroforetické merania sa vykonávajú meraním častíc v stacionárnej vrstve, v presnej polohe blízko stien cely. S tzv. technikou M3 sa môže vykonávať meranie v ktoromkoľvek bode v cele, hoci prístroje rady Zetasizer Nano merania vykonávajú uprostred cely. M3 sa skladá z merania pomalého otáčania poľa „Slow Field Reversal“ (SFR) a rýchleho otáčania poľa „Fast Field Reversal“ (FFR), z toho dôvodu je názov meranie v zmiešanom režime „Mixed Mode Measurement“.^{127,128,129}



Obrázok 2.31 Závislosť zeta potenciálu od pH¹²⁹

Postupnosť merania metódou M3 je v nasledujúcich krokoch: meranie rýchleho otáčania poľa sa prevádza v strede cely (takto je možné presné stanovenie priemeru), vykoná sa rýchle otáčanie poľa (toto dáva lepšie rozlíšenie, ale hodnoty pohyblivosti sú posunuté vplyvom elektroosmózy), priemerné zeta potenciály vypočítané z meraní FFR a SFR sa odčítajú pre stanovenie osmotického tlaku, hodnota pre elektroosmózu sa používa pre výpočet zeta potenciálu steny cely.^{127,128,129}

Výhodou používania M3 sa celé meranie zeta potenciálu zjednodušuje. Obsluha už nemusí voliť akékoľvek parametre systému merania — vypočítajú sa ako postupnosť M3. Presnosť a opakovateľnosť merania sa zlepšuje so znížením premenných merania. M3 sa teraz kombinuje s meraním PALS (viď nižšie).^{127,128,129}

Fázová analýza rozptylu svetla (Phase Analysis Light Scattering, PALS) — je ďalším zlepšením tradičnej laserovej dopplerovej velocimetrie a začlenením M3 popísanej vyššie. Aplikácia PALS zlepšuje presnosť meraní nízkych pohyblivostí častíc. Dosahuje sa zvýšenie výkonu viac ako 100-krát, ako pri štandardných meracích technikách. Metóda umožňuje meranie vzoriek s vysokou vodivosťou, a takisto presne meria vzorky, ktoré majú nízku pohyblivosť častíc.^{127,128,129} Pre merania v ktoromkoľvek bode cely a získanie elektroforetickej pohyblivosti spoločnosť Malvern vyvinula techniku M3-PALS, ktorá je patentovaná. Je to kombinácia zlepšenej metódy laserovej dopplerovej velocimetrie firmy Malvern — technika merania M3 a aplikácie PALS — fázovej analýzy rozptylu svetla „Phase Analysis Light Scattering“.^{127,130,131,132}

3 EXPERIMENTÁLNA ČASŤ

3.1 POPIS POUŽITÝCH PRÍSTROJOV A METÓD

3.1.1 Fluorimetrický spektrometer

Na stanovenie pomocnej látky bolo použité zariadenie Horiba Jobin Yvon model FluoroMax-4 (Horiba, Kyoto, Japonsko) veľkosť štrbín bola nastavená na 5 nm. 2 g vzorky sa zmerajú pri 365 nm. Fluorescencia nesmie byť intenzívnejšia ako fluorescencia roztoku obsahujúceho 0,1 ppm *quinine sulfate* Rv 0,005 M kyseliny sírovej meranej za tých istých podmienok. Meranie bolo vykonané v 10 mm fluorescenčnej kyvete.

Na zjednodušenie merania sa vykonalo porovnanie vizuálnym hodnotením naneseného rovnakého objemu tých istých roztokov na sklenenú platňu a hodnotených pri 365 nm UV lampou Camag s UV kabinetom II a zaznamenaných cez videodokumentačný systém Camag Reprostar 3 (Camag, Muttentz, Švajčiarsko).

3.1.2 Infračervená spektroskopia v blízkej oblasti

Infračervené (IR) spektrá v blízkej oblasti boli merané na spektrometeri Nicolet 6700 FT-IR s nadstavcom Smart Near-IR UpDrift pre analýzu vzoriek difúznym odrazom (reflektanciou) a optickou sondou SabIR pre priame meranie v obaloch (Thermo Scientific, USA). Spektrá boli snímané 128 skenov s 4 cm^{-1} rozlíšením v oblasti $10000 - 4000\text{ cm}^{-1}$. Zariadenie bolo ovládané riadiacim softvérom Omnic 8 (Thermo Fisher Scientific). Spektroskopický softvér TQ Analyst 8 poskytuje vyhodnocovaciu techniku test odľahlosti (Distance match), ktorá posudzuje zhodu analyzovaného materiálu s niekoľkými definovanými triedami.

3.1.3 Disolúcia s UV-VIS spektrofotometrom

Na experimenty disolúcie bolo použité zariadenie Vankel VK 7000 miešadlový typ Dissolution System (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). Meranie bolo vykonané validovanou metódou. Prášková vzorka (180 mg) alebo jedna tableta bola vložená do 900 ml disolučného média (fosfátový pufor pH = 7,2), teplotou $37 \pm 0.5\text{ }^\circ\text{C}$ s rýchlosťou otáčok 100 rpm. Vzorky boli odoberané vo vopred stanovených časoch a filtrované cez $0,45\text{ }\mu\text{m}$ PTFE filter Simple Pure (Membrane Solutions, Kent, WA, USA) s veľkosťou pórov $0,45\text{ }\mu\text{m}$. Množstvo odobratého média bolo následne doplnené zodpovedajúcim množstvom čerstvého disolučného média. Výsledné množstvo bolo vyhodnotené a počítané ako percentuálne

vyjadrenie vzťahnuté na deklarované množstvo (Q [%]). Absorbancia (koncentrácia účinnej látky) roztoku vzorky a porovnávacieho roztoku bola meraná v 1cm kremennej kyvete v maxime absorbancie vlnovej dĺžky, oproti disolučnému médiu na zariadení Varian Cary 50 UV–VIS Spectrophotometer (Agilent Technologies). Meranie bolo vykonané pre šesť odberov. Všetky výsledky sú vyjadrené ako priemer \pm štandardná odchýlka týchto šiestich nezávislých meraní (mean \pm SD, $n = 6$).

3.1.4 Obsah vody

Stanovenie obsahu vody coulometricky bolo prevedené na zariadení titrátor 701 KF Titrino (Methrom, Herisau, Switzerland) podľa popisu Ph.Eur 9.1, kapitola 2.5.32 (Voda Microdetermination)¹³³ za použitia 200 mg API v 1 ml bezvodého metanolu. Meranie bolo opakované trikrát. Všetky výsledky sú vyjadrené ako priemer \pm štandardná odchýlka, týchto troch nezávislých meraní (mean \pm SD, $n = 3$).

3.1.5 Vysokoučinná kvapalinová chromatografia

Na stanovenie obsahu nečistôt vo vzorke bolo použité zariadenie vysokoučinný kvapalinový chromatograf Alliance Separation Modul 2695, Dual Absorbance Detector 2487 s kolónovým termostatom (Waters Corp., Milford, MA, USA). HPLC separácia bola monitorovaná a vyhodnocovaná softvérom Empower 3 build 3471 Feature Release 2, Waters 2010 (Waters Corp.). Použité kolóny a podmienky analýz sú diskutované pri jednotlivých prípadových štúdiách.

3.1.6 Hmotnostná spektrometria

LC-MS analýza pre určenie nečistôt vo vzorkách bola vykonaná na zariadení UHPLC-HRMS separačnom systéme Dionex UltiMate 3000 (Thermo Scientific, USA) vybavenom diode array detektorom a LTQ Orbitrap XL Hybrid Mass Spectrometrom (Thermo Scientific, USA) v negatívnom móde ESI, TIC MS Orbitrap XL (ThermoFisher Scientific, USA/Dionex RSLC, Dionex, USA). Použitá bola kolóna Hypersil GOLD™ C18 HPLC column, 150 mm \times 2.1 mm, 3.0 μ m (Thermo Scientific, USA).

3.1.7 RTG prášková difrakcia

PXRD štruktúra bola meraná na PANalytical X'PERT PRO MPD diffractometri (PANalytical B.V., Almelo, Holandsko) s Cu K α žiarením (45 kV, 40 mA). Práškové vzorky

boli nanosené do Silica platničkového držiaka. Údaje boli zaznamenané v rozsahu $2 - 40^\circ 2\theta$, s veľkosťou kroku $0.01^\circ 2\theta$ a skenovacou rýchlosťou 50s/krok.

3.1.8 Diferenčná skenovacia kalorimetria

Na meranie krivky pomocou diferenciálnej skenovacej kalorimetrie (DSC) bol použitý prístroj DSC1 (Mettler-Toledo, Schwerzenbach, Švajčiarsko). Maximálna hmotnosť vzorky bola 3,5 mg a na vzorku sa použila štandardná Al miska. Záznam DSC krivky bol v rozsahu 50–300 °C pri rýchlosti 10.0 °C/min pod dusíkovou atmosférou.

3.1.9 Meranie veľkosti častíc

Meranie veľkostí častíc/zhlukov vo vzorke bolo merané laserovou difrakčnou analýzou na zariadení HELOS/KR (SympaTec, Clausthal-Zellerfeld, Nemecko) za použitia kombinácie Mieho a Fraunhoferovej teórie pre výpočet. Namerané údaje boli štatisticky vyhodnotené z meraní troch typov objektívov (v rozsahu od 100 nm do 30 mm). Merania boli opakované päťkrát. Všetky výsledky sú vyjadrené ako priemer \pm štandardná odchýlka, týchto piatich nezávislých meraní (mean \pm SD, $n = 5$).

3.1.10 Skenovacia elektrónová mikroskopia

Morfológia vzoriek bola pozorovaná za použitia skenovacieho elektrónového mikroskopu (SEM). Vzorka bola pokrytá vrstvou zlata, aby sa predišlo nežiaducim vodivostným interakciám. Vzorky boli analyzované na zariadení EDX analyzer (Zeiss EVO LS10, Zeiss, Nemecko) za použitia urýchľovacieho napätia 10,0 kV, s pracovnou vzdialenosťou 8,0 mm a vodivostnou sondou 100 pA.

3.1.11 Špecifický povrch

Plocha špecifického povrchu bola stanovená za použitia zariadenia Quantachrome NOVA 2200 analyser (Quantachrome Instruments, Boynton Beach, FL, USA). Vzorky boli odplynené použitím vákua pri teplote 90 °C počas troch hodín. Odplynené vzorky boli presunuté do meracej komory a znovu bolo použité vákuum pri tlaku okolo 1.33×10^{-6} MPa. Komora bola následne naplnená čistým dusíkom s tlakovým pomerom p/p_0 od 0,03 do 0,5. Namerané údaje (z celkovej absorpcie a desorpcie) boli vyhodnotené Brunauer-Emmet-Teller izotermou¹³⁴ a boli určené hodnoty špecifického povrchu. Merania boli opakované trikrát.

Všetky výsledky sú vyjadrené ako priemer \pm štandardná odchýlka, týchto troch nezávislých meraní (mean \pm SD, $n = 3$).

3.1.12 Kontaktný uhol a zmáčavosť

Pre každú vzorku, ktorá bola vo forme prášku, boli pripravené tablety, na štandardne používanom lise pre meranie IR pri tlaku 80 kN za čas 20 s. Ako médium boli použité kvapky (5 μ L) fosfátového pufru (pH = 7,2). Kontaktný uhol bol meraný pri 25 °C na zariadení OCA20 (DataPhysics, Applied Photophysics, Leatherhead, UK) za použitia metódy sediacej kvapky „sessile drop method“. Meranie bolo prevedené v šesnástich opakovaniach a štatisticky vyhodnotené (mean \pm SD, $n = 16$).

3.1.13 Zeta potenciál

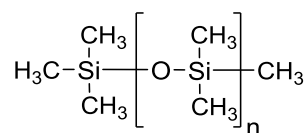
Zeta potenciál bol meraný za použitia zariadenia Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments, Malvern, UK) pomocou elektroforetického rozptylu svetla. Zeta potenciál vzoriek bola meraný v sklenených kyvetách s vloženou ponornou kyvetou. Prístroj deteguje Dopplerov posun medzi laserovým lúčom (5 mW, 633 nm), ktorý prechádza kyvetou so vzorkou, a referenčným lúčom prechádzajúcim mimo kyvetu. Vzorka bola pripravená rozpustením práškovej API vo fosfátovom pufri (pH = 7,2) s dosiahnutím konečnej koncentrácie 0,2 mg/ml. Meranie bolo prevedené pri laboratórnej teplote (25.0 \pm 0.1 °C). Merania boli opakované štyrikrát. Všetky výsledky sú vyjadrené ako priemer \pm štandardná odchýlka, týchto štyroch nezávislých meraní (mean \pm SD, $n = 4$).

3.2 VÝSLEDKY A DISKUSIA

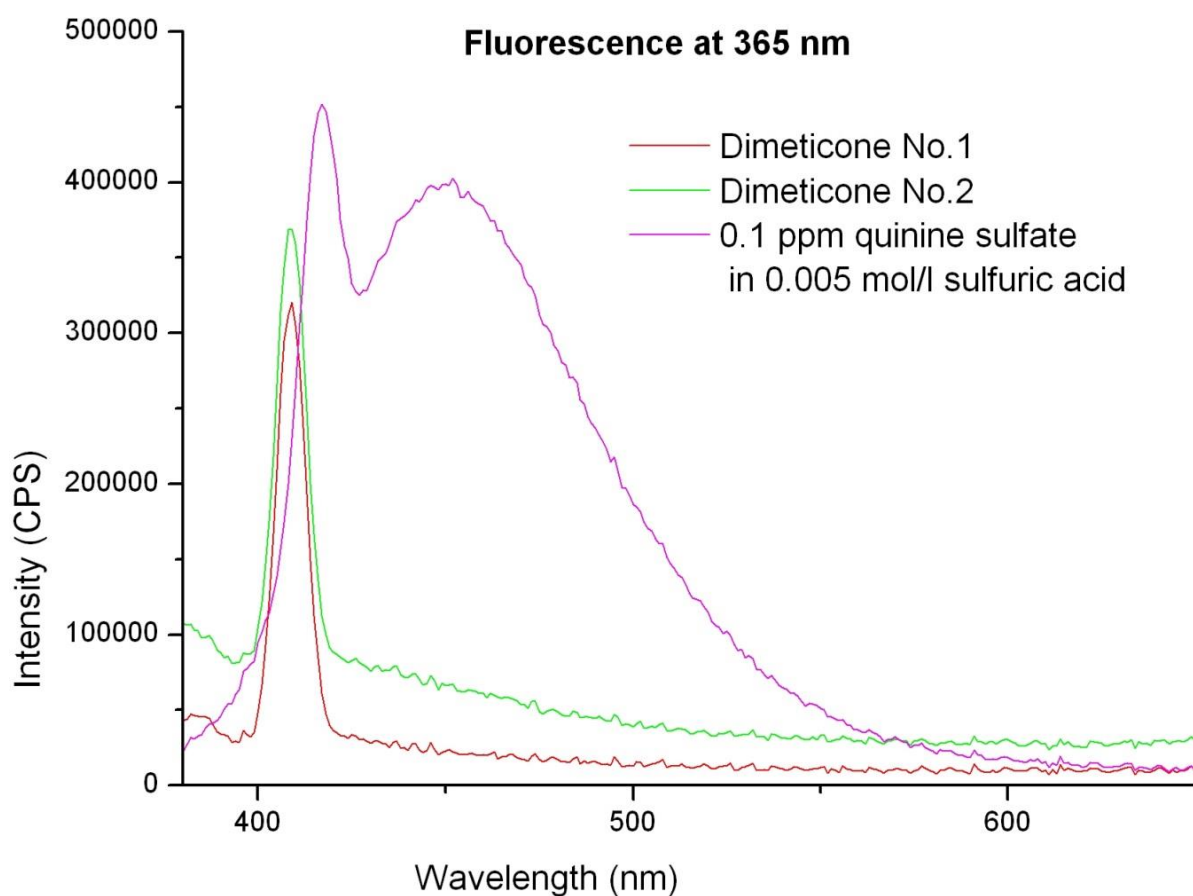
Táto kapitola rozoberá jednotlivé riešené problémy. Preto bola rozdelená na štyri prípadové štúdie, v rámci ktorých sú rôznymi metodikami hodnotené pomocné látky, API alebo nečistoty, ktoré vznikli v rôznych typoch finálnych liekových prípravkov.

3.2.1 Prípadová štúdia 1 — Hodnotenie excipientu

V súvislosti s novým dodávateľom minerálneho oleja dimetikonu (Obrázok 3.1 znázorňuje jeho štruktúru), ako pomocnej látky, pre formulácie bolo prevedené meranie na fluorescenčnom spektrometri, záznam vid' Obrázok 3.2.



Obrázok 3.1 Štruktúra dimetikonu

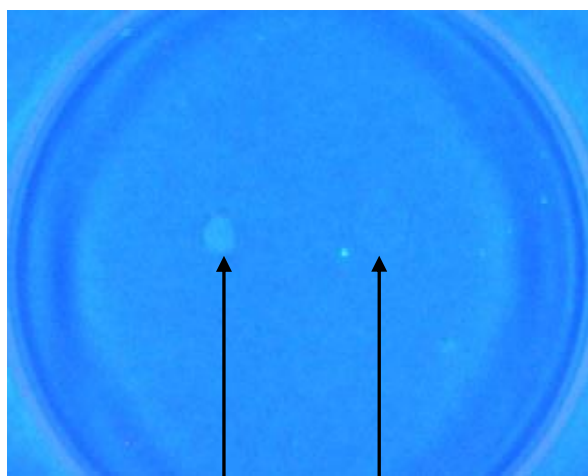


Obrázok 3.2 Namerané fluorescenčné spektrá vzoriek a referenčného roztoku

Na základe požiadavky liekopisného článku Ph.Eur. 01/2017:0138,¹³⁵ kde fluorescencia vzorky nesmie byť intenzívnejšia ako fluorescencia porovnávacieho roztoku, ktorý obsahuje síran chinínu *R* meraný za tých istých podmienok, bolo vyhodnotené, že vzorky vyhovujú požiadavke liekopisu.

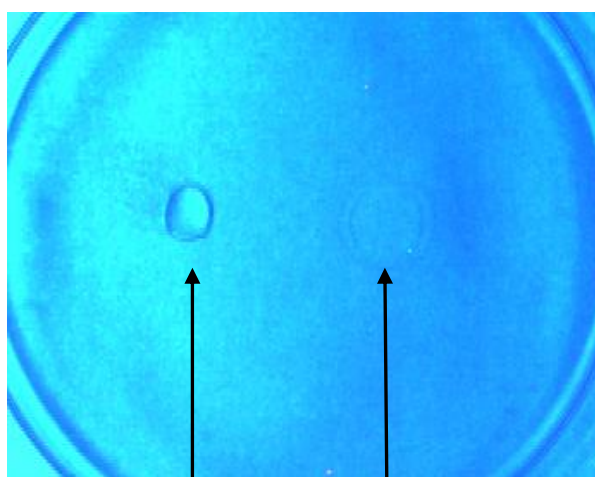
Doplnkovo boli vzorky porovnané aj vizuálnym hodnotením a to nanesením rovnakého objemu tých istých roztokov na sklenenú platňu a hodnotených pri 365 nm UV lampou Camag s UV kabinetom II a zaznamenaných cez videodokumentačný systém Camag Reprostar 3, vid' Obrázok 3.3 a Obrázok 3.4.

Z uvedených obrázkov je vidieť, že vzorky vykazujú menšiu intenzitu ako roztok porovnávací a teda vyhovujú požiadavke liekopisu.



porovnávací roztok vzorka 1

Obrázok 3.3 Vizuálne hodnotenie porovnávacieho roztoku a vzorky 1



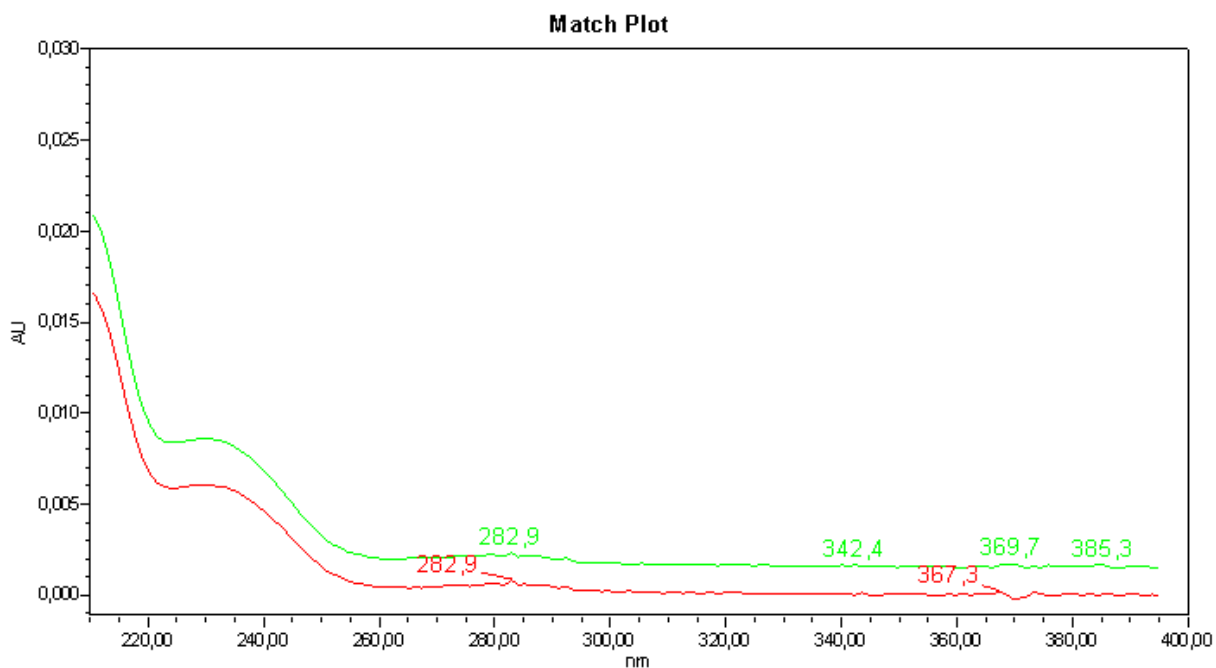
porovnávací roztok vzorka 2

Obrázok 3.4 Vizuálne hodnotenie porovnávacieho roztoku a vzorky 2

3.2.2 Prípadová štúdia 2 — Vplyv excipientov na stabilitu liekovej formy

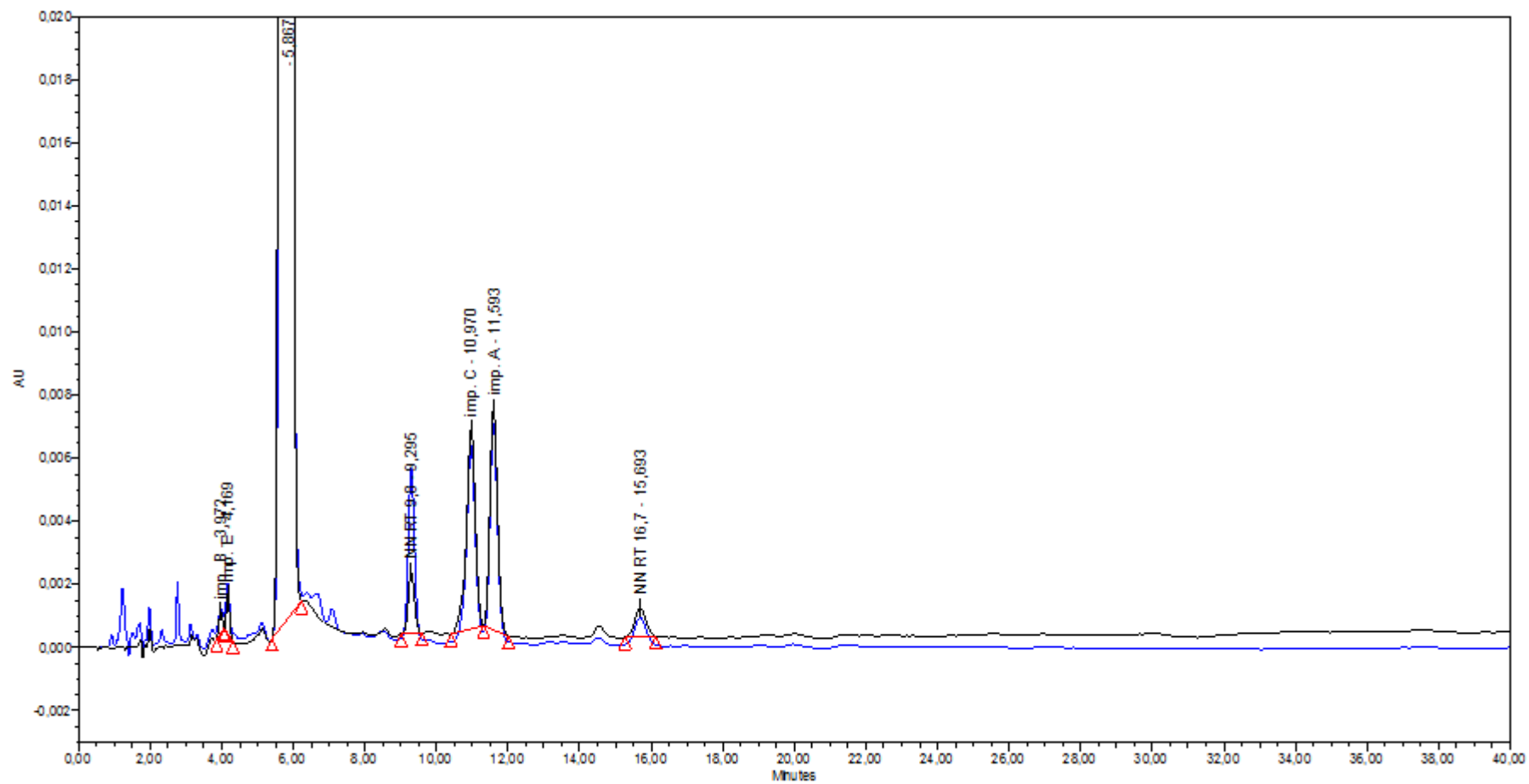
Stabilitné hodnotenie tabliet s obsahom účinnej látky „X“ vykázalo postupný nárast neznámej nečistoty s RRT 1,6. Táto nečistota podľa predpísanej špecifikácie bola hodnotená ako neznáma nečistota. Porovnaním so štandardnom bola neznáma nečistota určená ako identifikovaná známa nečistota na základe zhody RT a spektrálnej zhody píkovo metódou HPLC, vid' Obrázok 3.5.

Nakoľko stabilitné hodnotenie čistej API „X“ nevykázalo nárast uvedenej nečistoty, tak bolo pristúpené k sledovaniu vplyvu excipientov na nárast nečistoty RRT 1,6 vo finálnej liekovej forme, vid' Obrázok 3.6. Na stanovenie bola použitá chromatografická kolóna Symmetry[®] C8 5 µm, 4.6×250 mm, Part No. WAT054270 (Waters Corp.). Mobilná fáza bola pripravená z 1,08 g oktánsulfonátu sodného v 20 ml kyseliny octovej ľadovej a 250 ml acetonitrilu a zriedi sa do 1000 ml vodou Milli-Q (Merck Group, Darmstadt, Nemecko). Prietok bol nastavený na 2,0 ml/min a objem nástreku bol 10 µl — pre stanovenie API a prietok 1,8 ml/min a objem nástreku 20 µl — pre stanovenie finálnej liekovej formy, teplota kolóny a vzorky bola nastavená na 25 °C. Detekcia bola nastavená na hodnotu 245 nm.



•	Peak Name	RT (min)	Area	PDA Match1 Angle	PDA Match1 Threshold	PDA Match1 Flag	zhoda	Area ($\mu\text{V} \cdot \text{sec}$)
1	imp. B	10,536	6354			No		6354
2	imp. E	12,014	14023			No		14023
3	imp. RT 15	15,051	38229			No		38229
4	API X	16,033	25556248			No		25556248
5	imp. RT 17,7	17,787	21114			No		21114
6	imp.RRT 1,6	20,200	68465	2,039	3,469	No	pozitivna	68465
7	imp. RT 21,4	21,353	10283			No		10283
8	imp. A	22,772	80041			No		80041
9	imp. C	23,809	94638			No		94638
10	imp.RT 27	27,755	21961			No		21961
11	imp. RT 36,2	36,195	8987			No		8987

Obrázok 3.5 Stanovenie spektrálnej totožnosti vyšetrovanej nečistoty identifikovanej podľa RT vzhľadom k štandardu uvedenej nečistot



Obrázok 3.6 Chromatografický záznam zloženia tablety a rovnakej šarže použitej API

Na sledovanie vplyvu pomocných látok na nárast neznámej nečistoty s RRT 1,6 boli podľa zloženia tablety, vid' Tabuľka 3.1 pripravené binárne zmesi v zhodnom percentuálnom zastúpení ako v tablete, pričom boli použité rovnaké šarže jednotlivých surovín ako sa použili vo vyšetrovanej šarži liekovej formy.

Tabuľka 3.1 Zloženie tablety

Zloženie
API „X“
stearan horečnatý
monohdrát laktózy
zemiakový škrob
želatína
mastenec

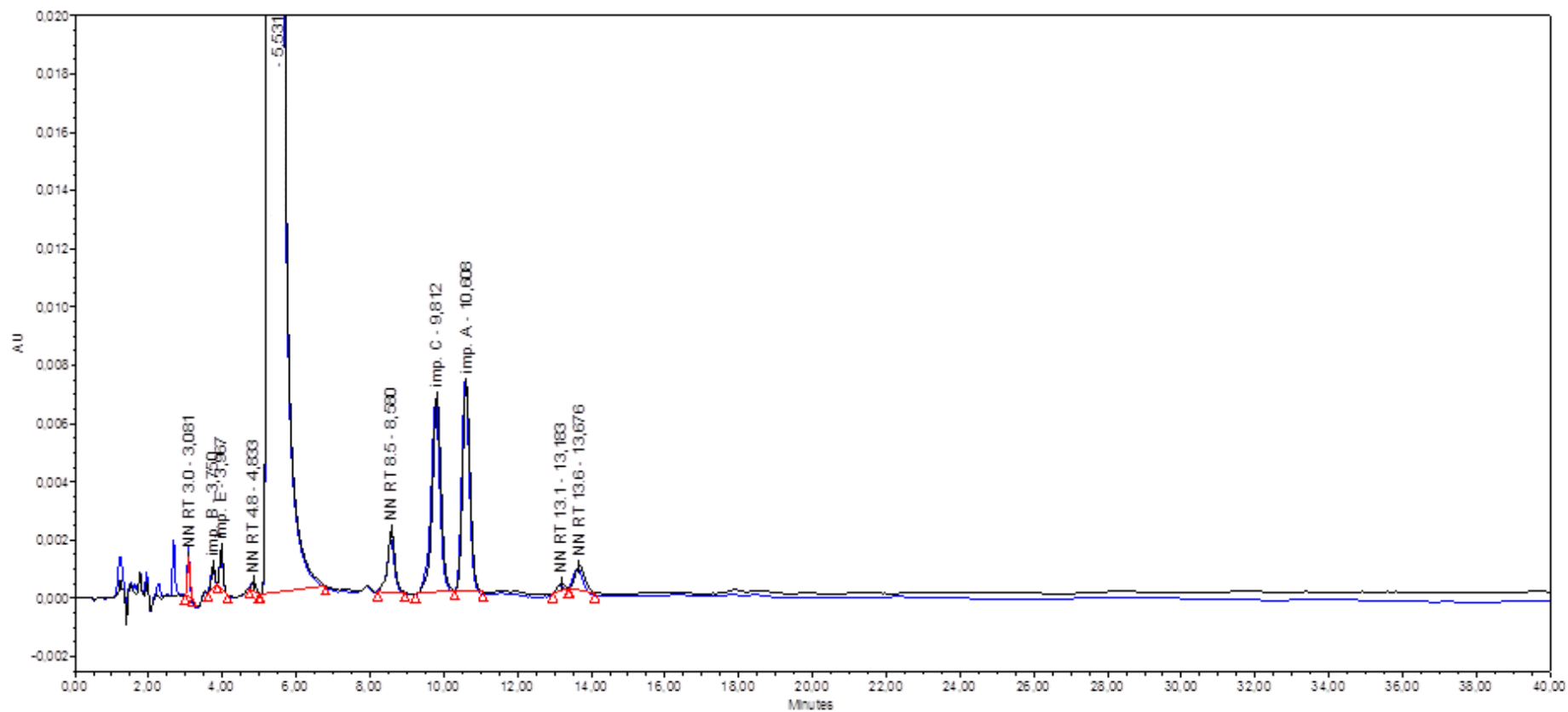
Pripravené binárne zmesi boli hodnotené nasledujúcimi metódami:

- 1. metódou HPLC** (vid' vyššie) validovanou, štandardne používanou na prepúšťanie finálneho prípravku a to pri troch podmienkach:
 - v čase 0 bez pôsobenia teploty a vlhkosti — táto vzorka bola použitá ako porovnávacía vzorka (blank)
 - pri teplote 80°C/24 hod(zrýchlený záťažový test)
 - pri teplote 80°C/24 hod/prídavok 10% hmotnostných vody Milli-Q (zrýchlený záťažový test)
- 2. metódou DSC** metóda vybraná na sledovanie zmien vo vzorkách

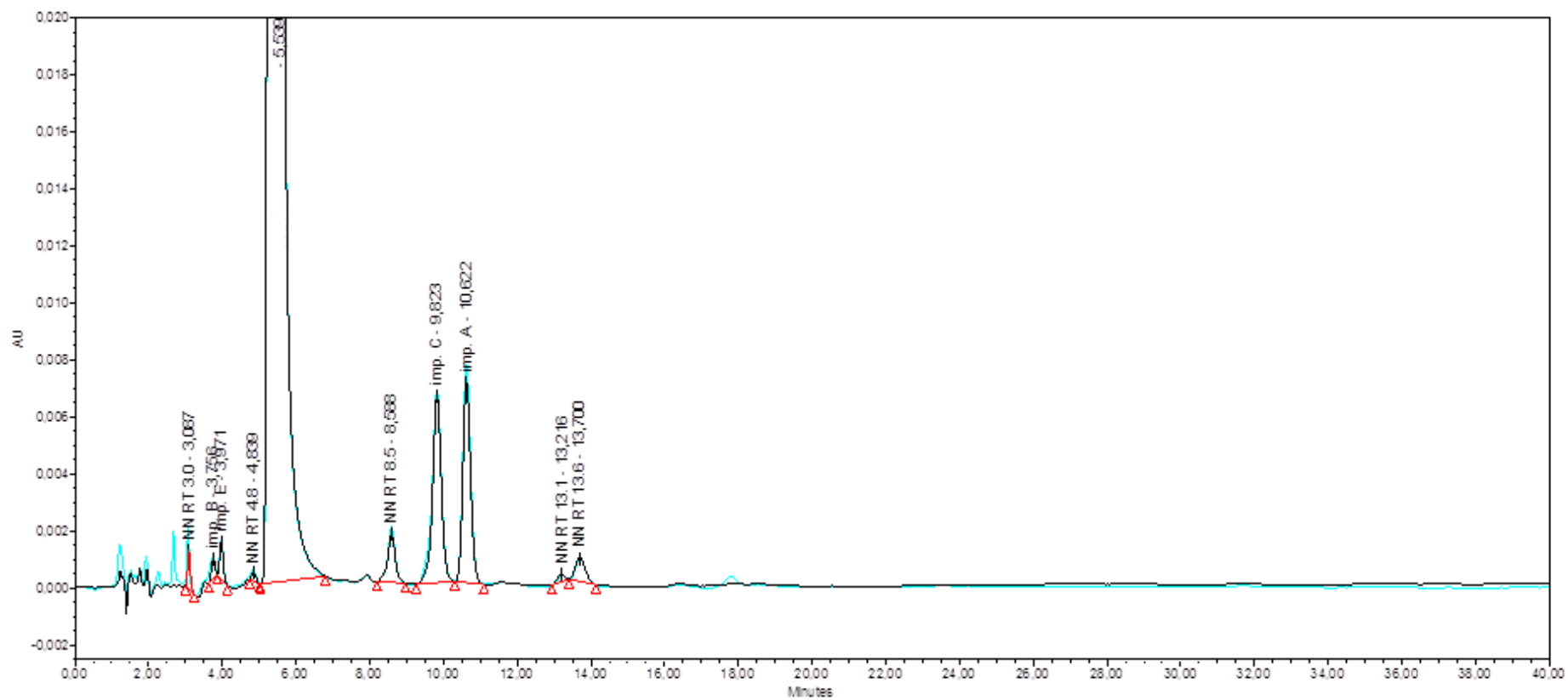
Výsledky hodnotenia metódou HPLC

Na nasledujúcich obrázkoch (Obrázok 3.7 — Obrázok 3.13) sú chromatogramy zmesi API „X“ a všetkých excipientov ako v tablete a binárnej zmesi API „X“ a excipientu monohdrátu laktózy, ktorý vykazoval vplyv na nárast sledovanej nečistoty RRT 1,6 pri zvolených troch podmienkach. Tabuľka 3.2 sumarizuje výsledky pri hore uvedených podmienkach.

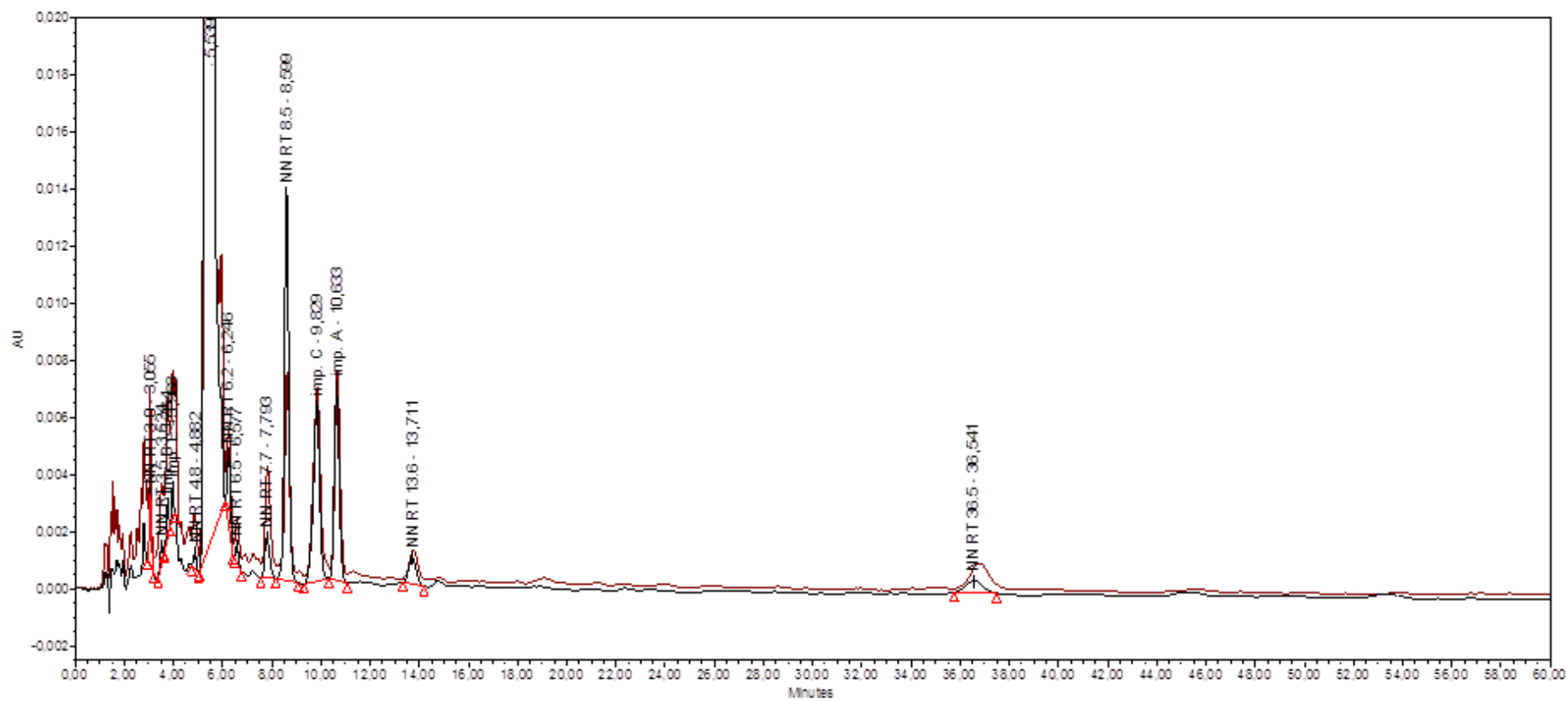
Binárne zmesi



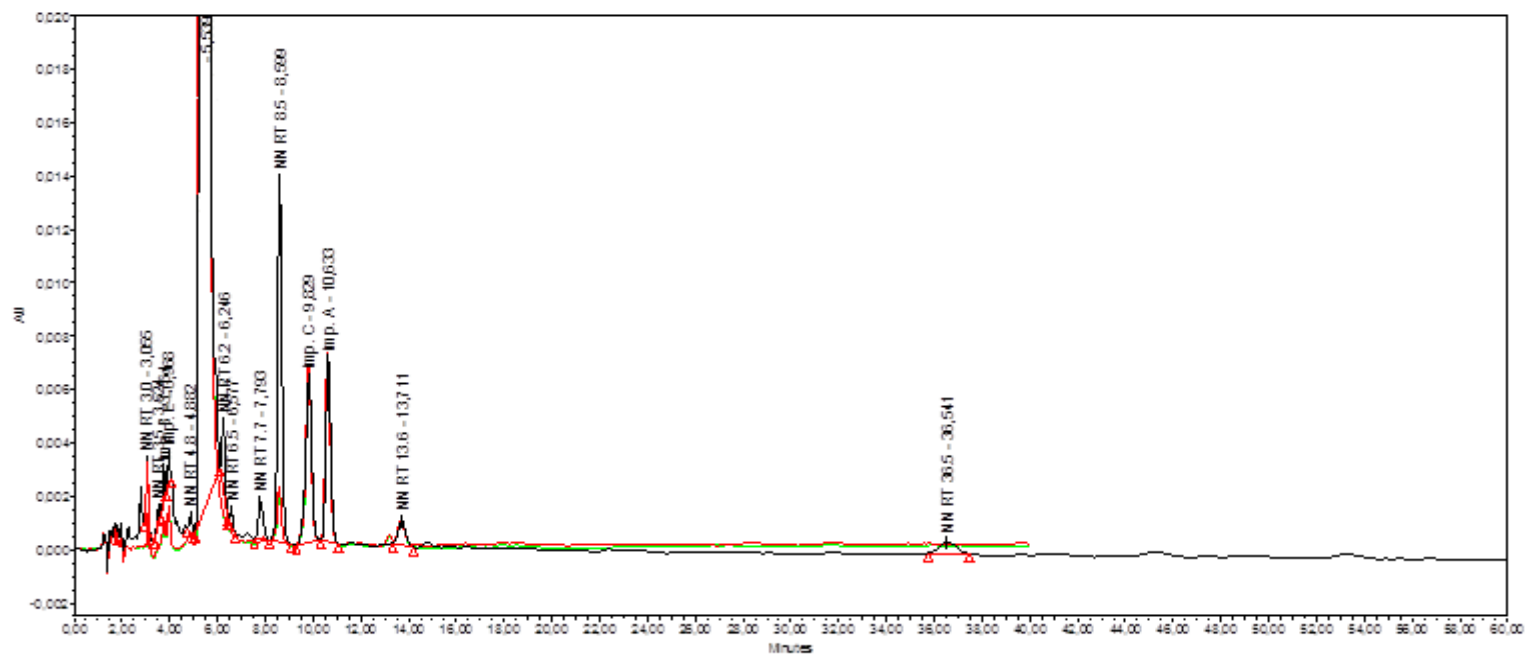
Obrázok 3.7 Chromatografické záznamy — bez pôsobenia (*blank*): monohydrát laktózy + API „X“ a zmes všetkých zložiek ako v tablete



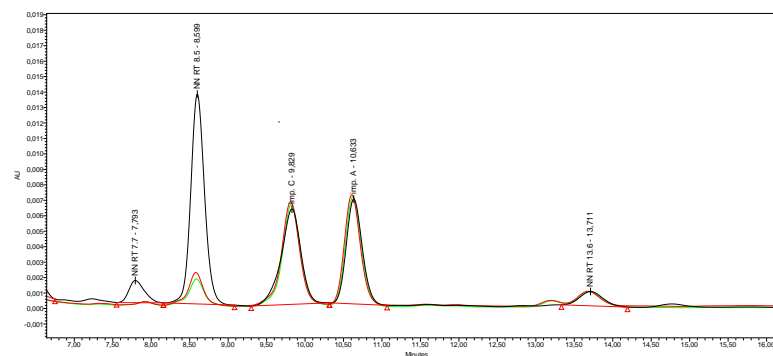
Obrázok 3.8 Chromatografické záznamy — pri teplote 80 °C/24 hod: monohydrát laktózy + API „X“ a zmes všetkých zložiek ako v tablete



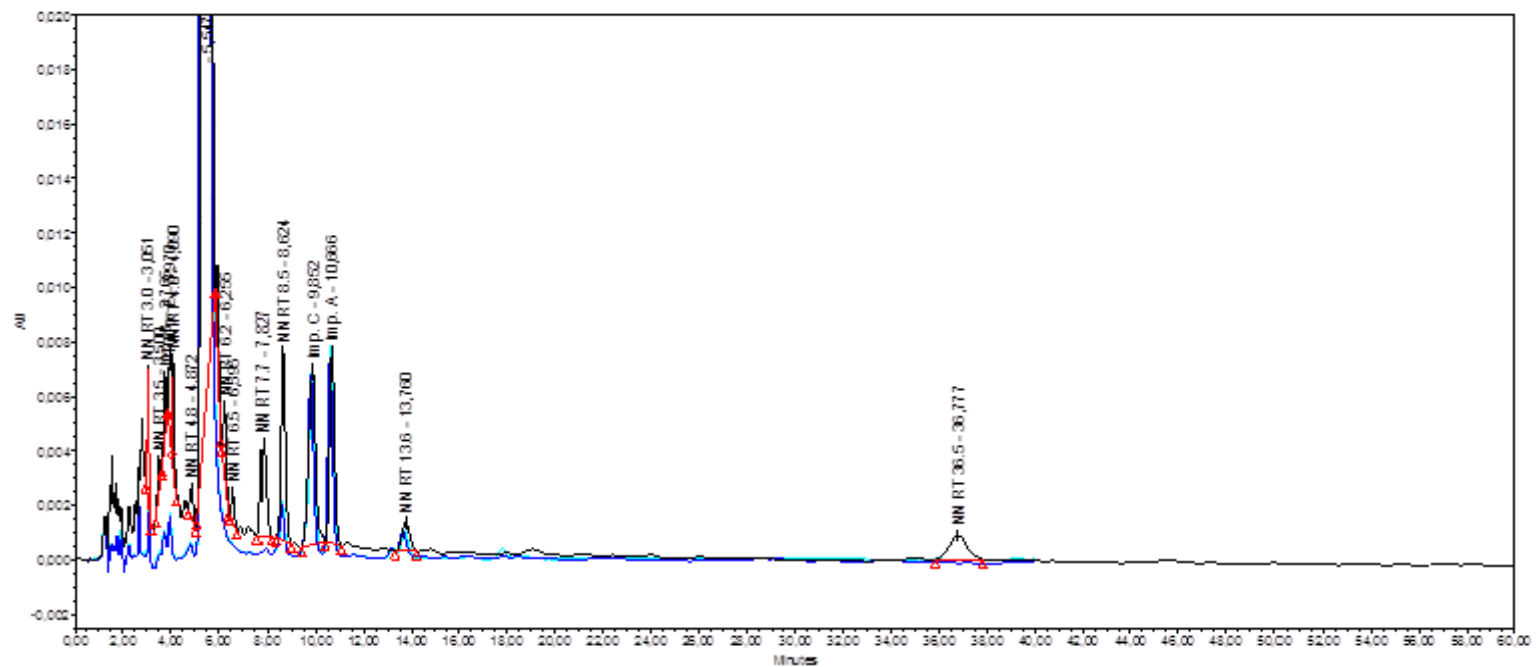
Obrázok 3.9 Chromatografické záznamy — pri teplote 80 °C/24 hod/prídavok 10 % hm. vody: monohydrát laktózy + API „X“, a zmes všetkých zložiek ako v tablete)



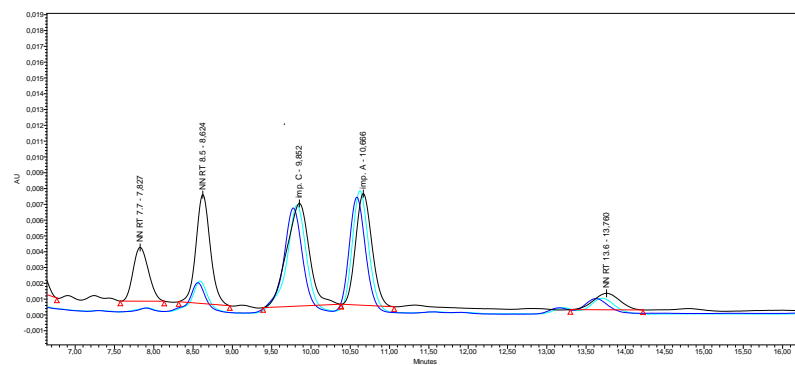
Obrázok 3.10 Preložené chromatografické záznamy — binárnej zmesi (monohydrát laktózy + API „X“) pri troch zvolených sledovaných podmienkach: blank, 80 °C/24 hod, 80 °C/24 hod/prídavok 10 % hm. vody)



Obrázok 3.11 Zväčšená oblasť chromatografických záznamov z Obrázok 3.10



Obrázok 3.12 Preložené chromatografické záznamy — zmesi všetkých zložiek ako v tablete: pri troch zvolených sledovaných podmienkach: blank, 80 °C/24 hod, 80 °C/24 hod/prídavok 10 % hm. vody)



Obrázok 3.13 Zväčšená oblasť chromatografických záznamov z Obrázok 3.12

Tabuľka 3.2 Sumarizácia výsledkov nameraných metódou HPLC

<i>excipient + API</i>	Porovnávací vzorka (bez pôsobenia teploty a vlhkosti)						Vzorka pri pôsobení iba teploty 80 °C/24 hod						Vzorka pri pôsobení teploty 80 °C/24hod + 10%hm. voda						
	imp. B	imp. E	imp. C	imp. A	imp. RRT 0,56	imp. RRT 1,6	imp. B	imp. E	imp. C	imp. A	imp. RRT 0,56	imp. RRT 1,6	imp. B	imp. E	imp. C	imp. A	imp. RRT 0,56	imp. RRT 1,6	imp. RRT 6,6
želatína + API „X“	0,012	0,013	0,089	0,270	0,015	0,066	0,012	0,014	0,092	0,271	0,017	0,063	0,014	0,013	0,091	0,272	0,023	0,131	
stearan horečnatý + API „X“	0,012	0,014	0,089	0,270	0,018	0,063	0,010	0,013	0,091	0,273	0,020	0,066	0,012	0,014	0,090	0,273	0,024	0,109	
monohydrát laktózy API „X“	0,012	0,014	0,091	0,271	0,017	0,077	0,012	0,014	0,090	0,273	0,019	0,066	0,020	0,010	0,092	0,262	0,042	0,456	0,054
zemiakový škrob + API „X“	0,012	0,014	0,089	0,273	0,017	0,063	0,012	0,014	0,091	0,275	0,018	0,066	0,012	0,014	0,092	0,275	0,019	0,089	
mastenec + API „X“	0,012	0,014	0,089	0,269	0,018	0,067	0,012	0,015	0,090	0,273	0,018	0,067	0,012	0,014	0,090	0,276	0,018	0,067	
placebo																			
API „X“	0,012	0,014	0,088	0,270	0,016	0,065	0,011	0,014	0,091	0,274	0,018	0,067	0,012	0,015	0,091	0,276	0,018	0,065	
všetky zložky spolu = tableta	0,012	0,013	0,019	0,274	0,021	0,067	0,013	0,013	0,092	0,278	0,023	0,071	0,034	0,034	0,106	0,268	0,062	0,229	0,121

Farebne označené: zistené nárasty nečistôt a sledovaná neznáma nečistota v binárnych zmesiach a zmena oproti porovnávacej vzorke

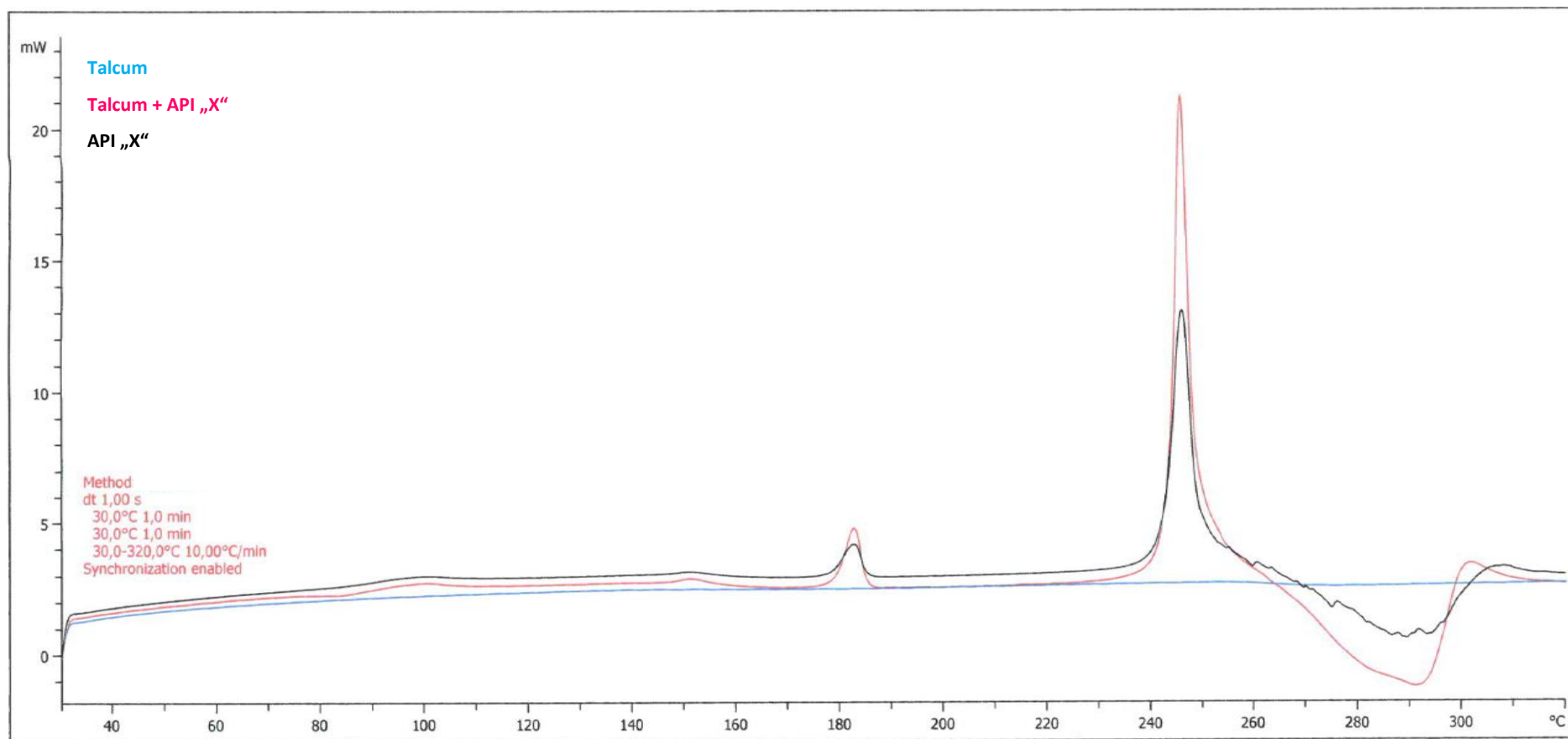
Výsledky hodnotenia metódou DSC

Na nasledujúcich obrázkoch (Obrázok 3.14 — Obrázok 3.18) sú jednotlivé záznamy, kde je možné porovnať vždy termogramy samotnej API, samotnej pomocnej látky a príslušnej binárnej zmesi pripravenej zmiešaním v hmotnostnom pomere 1 : 1.

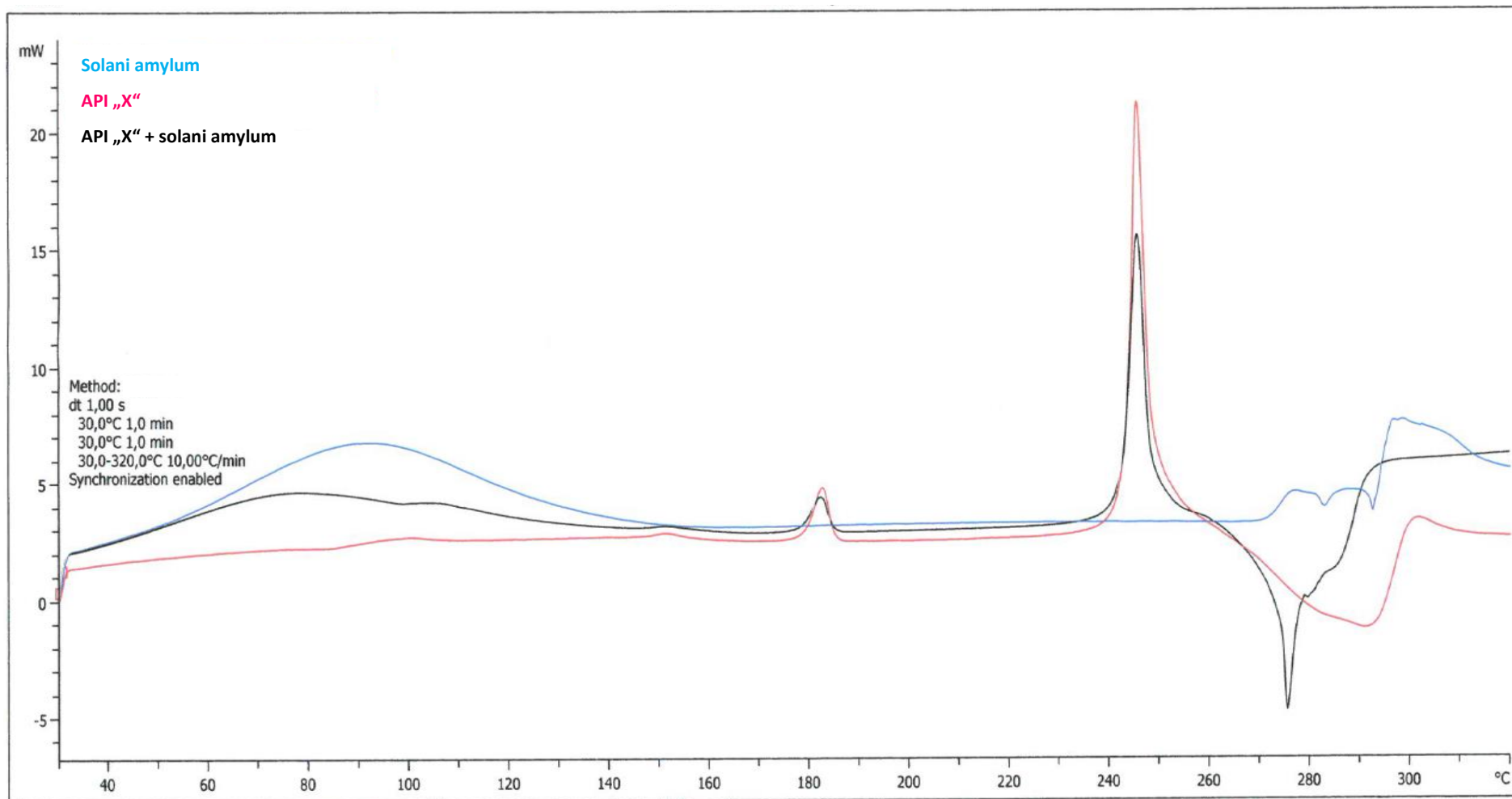
Samotná API vykazuje na termograme dve endotermy, zodpovedajúce strate vody a fázovej premene (topeniu).

Termogramy zmesi API „X“ s pomocnými látkami mastenec, zemiakový škrob, želatína sú superpozíciou individuálnych záznamov, a pri týchto excipientoch nie je pozorovaný žiadny nový tepelný efekt.

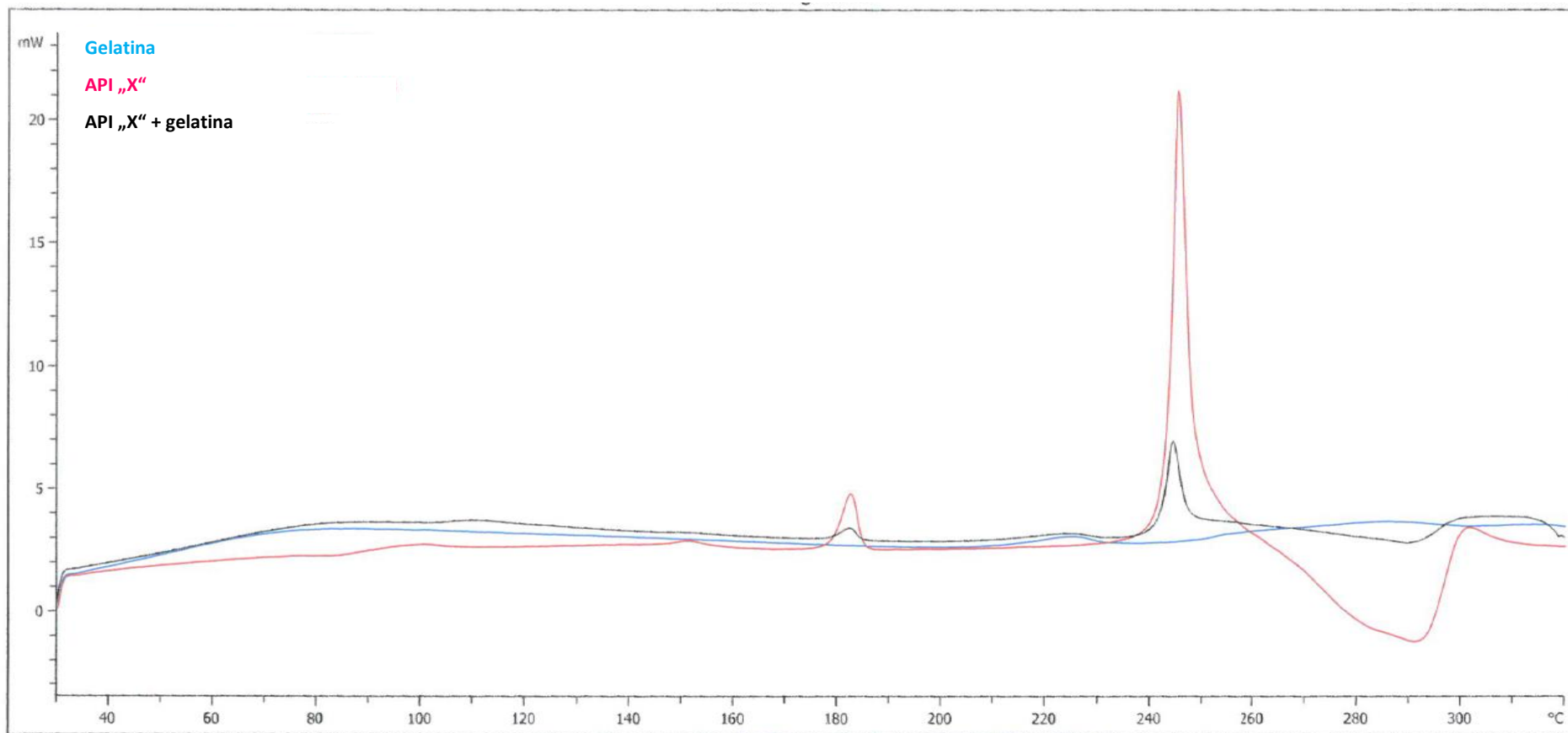
V prípade zmesí s pomocnými látkami stearan horečnatý, monohydrát laktózy dochádza k významnému posunu a deformácii píku zodpovedajúcemu topeniu API „X“. Možno predpokladať, že tieto dve pomocné látky sú schopné s API interagovať, alebo katalyzovať chemické zmeny vedúce k nárastu rozkladného produktu.



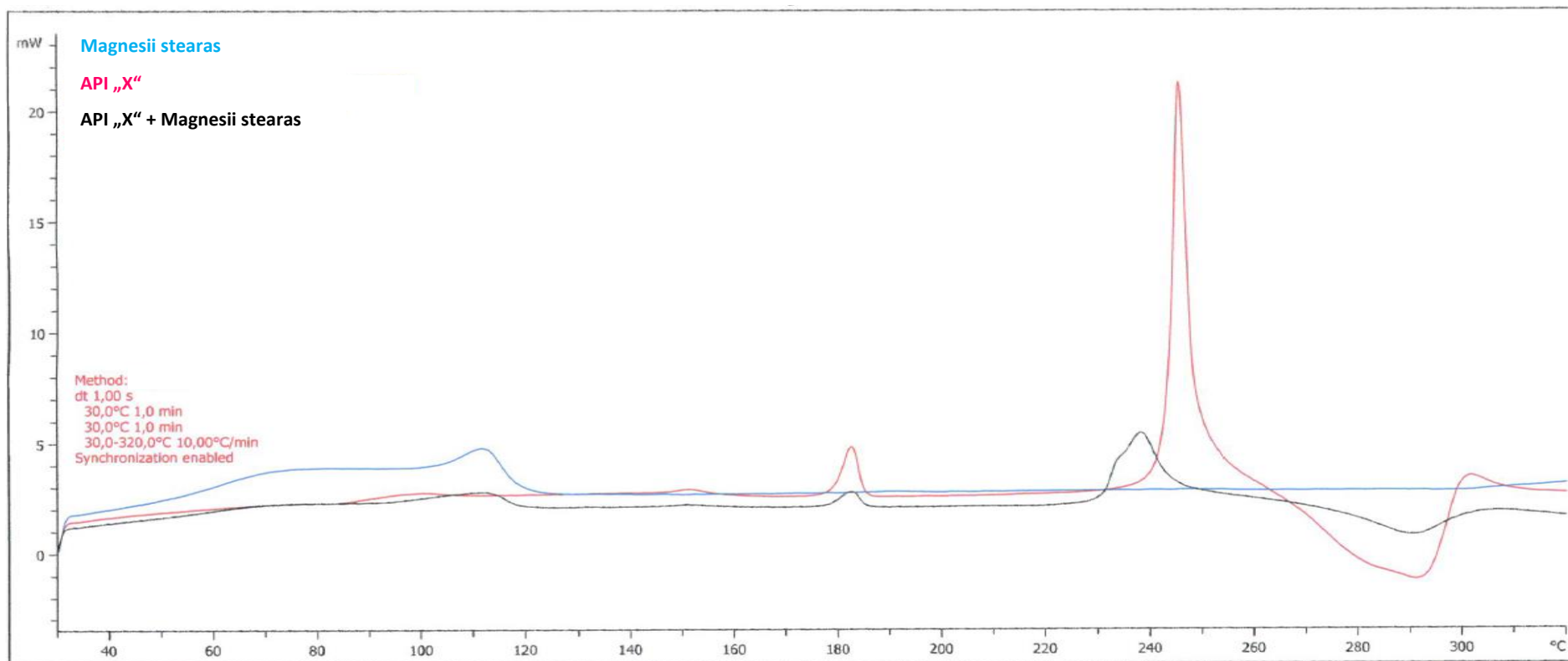
Obrázok 3.14 Termogramy zmesi API „X“ s pomocnou látkou mastenec



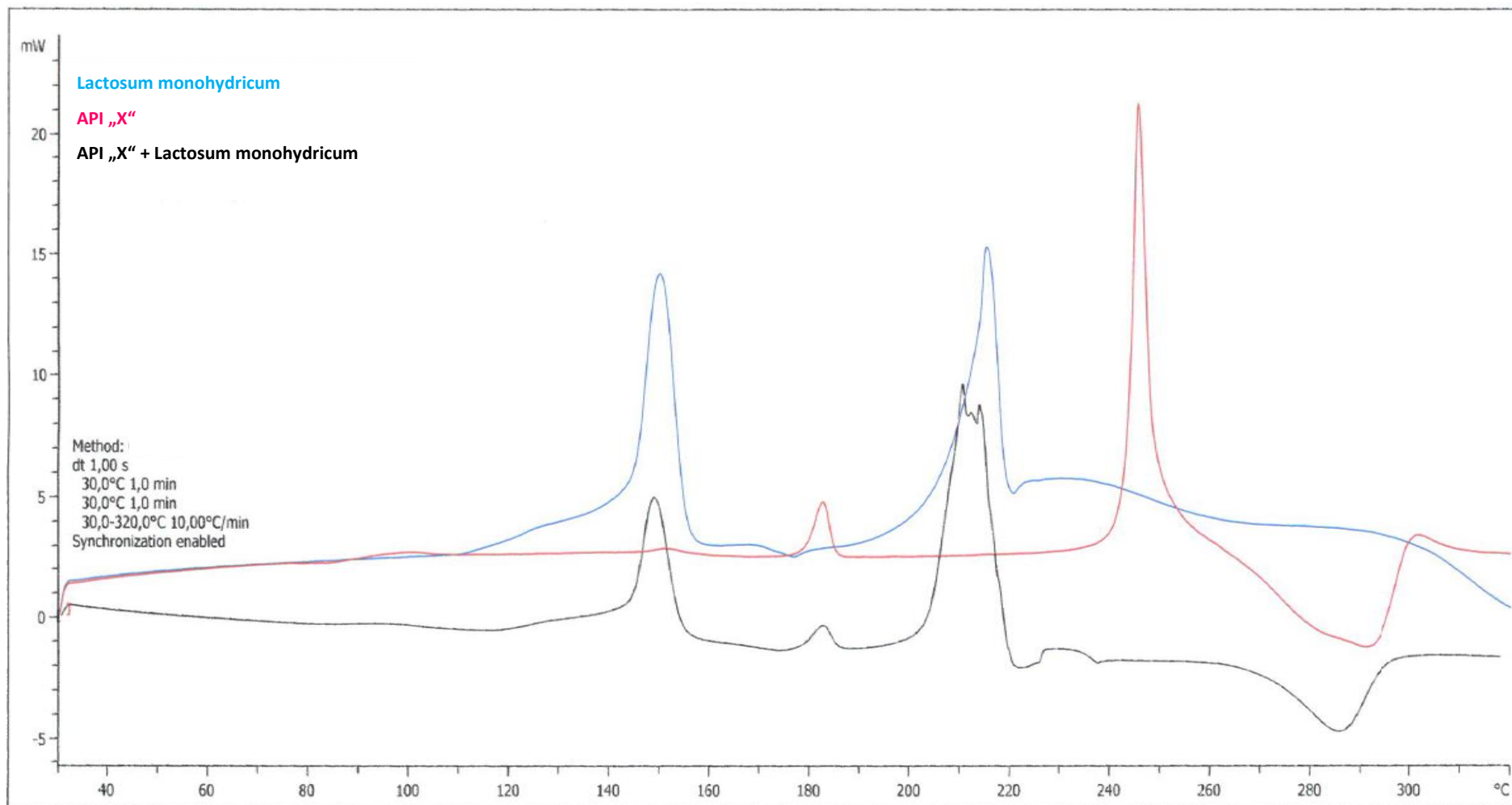
Obrázok 3.15 Termogramy zmesi API „X“ s pomocnou látkou zemiakový škrob



Obrázok 3.16 Termogramy zmesi API „X“ s pomocnou látkou želatína



Obrázok 3.17 Termogramy zmesi API „X“ s pomocnou látkou stearan horečnatý



Obrázok 3.18 Termogramy zmesi API „X“ s pomocnou látkou monohydrát laktózy

Záver

Na základe zhodnotenia výsledkov dosiahnutých meraním binárnych zmesí metódou HPLC pri rovnakom percentuálnom zložení excipient — API ako v tabletách, za podmienok bez pôsobenia teploty a času (blank), pri pôsobení teploty 80 °C po dobu 24 hod a pri pôsobení teploty 80 °C po dobu 24 hod s prídavkom 10 % hmotnostných vody, je vidieť, že sledovaná nečistota s RRT 1,6 rastie mierne v zložení s excipientom želatína a stearan horečnatý a výraznejší nárast je s excipientom monohydát laktózy za pôsobenia vplyvu teploty a vlhkosti.

Tento vplyv vlhkosti na nárast sledovanej nečistoty bol evidentný aj v porovnávej zmesi s excipientami všetkých zložiek (tableta).

Metódou DSC sa rovnako potvrdil vplyv interakcie binárnych zmesí excipientov stearanu horečnatého a monohydátu laktózy s API „X“.

Za ostatných nastavených podmienok binárnych zmesí, nie je evidentný vplyv teploty na nárast jednotlivých nečistôt. Rovnako nebol pozorovaný nárast ďalších neznámych nečistôt.

Vplyv vlhkosti by bolo možné eliminovať zmenou obalu finálneho prípravku, prípadne zmenou formulácie by bolo potrebné nahradiť monohydát laktózy iným excipientom.

3.2.3 Prípadová štúdia 3 — Vplyv cudzorodých nečistôt na stabilitu liekovej formy

Analýzou metódou HPLC podľa predpísanej špecifikácie boli zistené nevyhovujúce výsledky neznámej nečistoty RRT 0,41 v dvoch šaržiach prípravku obsahujúci ako liečivú látku API „Y“. Bolo zahájené vyšetovanie nevyhovujúceho výsledku. Postupne boli vyšetované rôzne odbery týchto nevyhovujúcich dvoch šarží. Opakovanou analýzou boli potvrdené nevyhovujúce výsledky.

Na stanovenie bola použitá reverzná chromatografická kolóna Spherisorb ODS2 Column, 80Å, 5 µm, 125 mm × 4 mm, Part No. PSS845543 (Waters Corp.). Podmienky analýzy metódou HPLC boli nastavené nasledovne: mobilná fáza, pozostávala z metanolu : tetrahydrofuránu : vody (23 : 20 : 57) o prietoku 1,5 ml/min, detekcia 235 nm, nástrek vzorky bol 100 µl a teplota kolóny bola 25 °C.

Vzorky boli analyzované taktiež s odstupom času jeden mesiac a vykazovali zvýšený obsah vyšetovanej neznámej nečistoty RRT 0,41; vid' Tabuľka 3.3. Analýzy boli vykonávané s porovnávacou vyhovujúcou šaržou (označenú ako šarža č. 3), ktorá mala obsah neznámych nečistôt na rovnakej úrovni ako pri prepúšťaní finálneho prípravku. Takisto bolo súbežne zahájené aj vyšetovanie vstupnej účinnej látky — API „Y“ vid' Tabuľka 3.4. Boli analyzované suroviny z protivzorky, zo zvyšku v sklade surovín, a vzorky poslanej od zmluvného výrobcu. Všetky výsledky analýz mali zhodné hodnoty nečistôt aj ako pri predchádzajúcej analýze. Vzorové chromatogramy uvádzajú Obrázok 3.19 — Obrázok 3.21.

Tabuľka 3.3: Obsah neznámej nečistoty RRT 0,41 vo finálnej liekovej forme (limit – max. 0,2 % pri prepúšťaní) a po 1 mesiaci (limit – max. 0,5 % počas doby použiteľnosti)

Finálna lieková forma	nečistota RRT 0,26 [%]	nečistota RRT 0,41 [%]	nečistota RRT 0,70 [%]	nečistota A RRT 0,78 [%]
šarža č. 1, vzorka č. 1	0,09	0,35	0,05	n.d.
šarža č. 1, vzorka č.2	0,09	0,37	0,05	n.d.
šarža č. 1, vzorka č. 3	0,09	0,36	0,06	n.d.
šarža č. 1, vzorka – po 1 mesiaci	0,09	0,49	0,05	n.d.

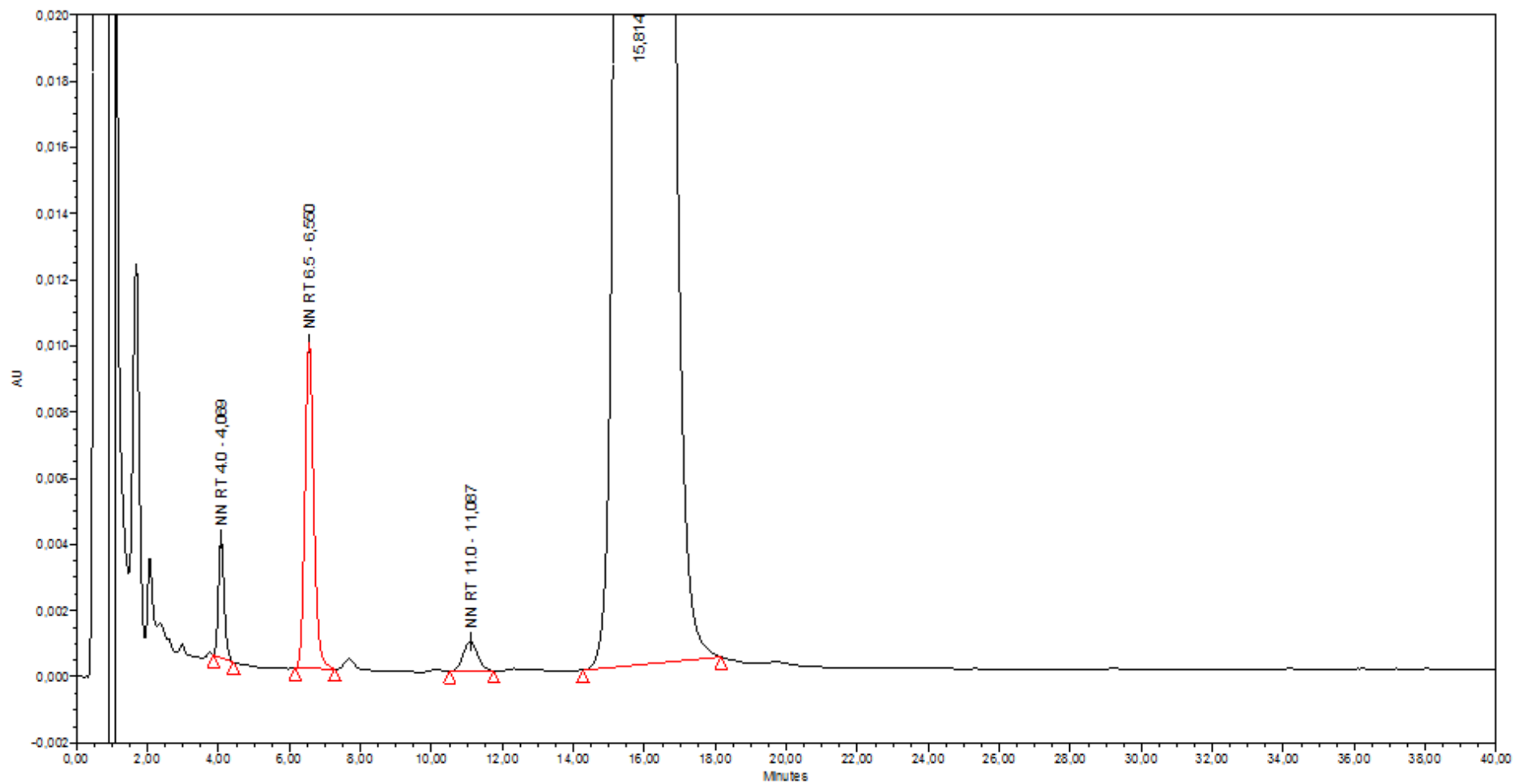
šarža č. 2, vzorka č. 1	0,05	0,23	0,05	n.d.
šarža č. 2, vzorka č.2	0,05	0,24	0,06	n.d.
šarža č. 2, vzorka č. 3	0,05	0,24	0,06	n.d.
šarža č. 2, vzorka – po 1 mesiaci	0,05	0,31	0,05	n.d.

Farebne označené: sledovaná neznáma nečistota a výsledky nad limit špecifikácie pre neznáme nečistoty – max. 0,1 %

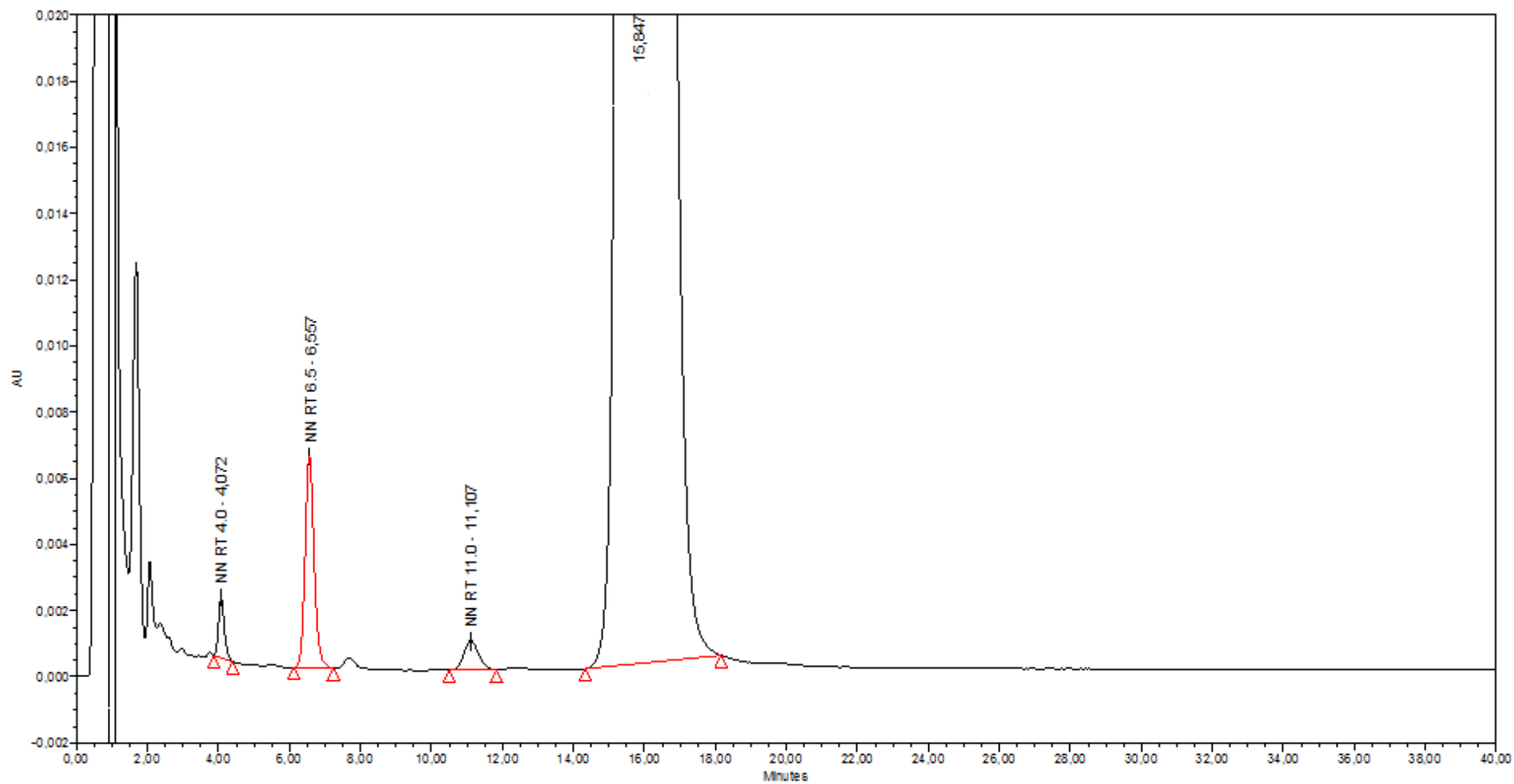
Tabuľka 3.4 Analýza vstupnej API „Y“

API	nečistota RRT 0,41 [%]	nečistota RRT 0,70 [%]	nečistota A RRT 0,78 [%]
šarža č. 1, vzorka č. 1	0,07	0,06	n.d.
šarža č. 1, vzorka č.2	0,07	0,06	n.d.

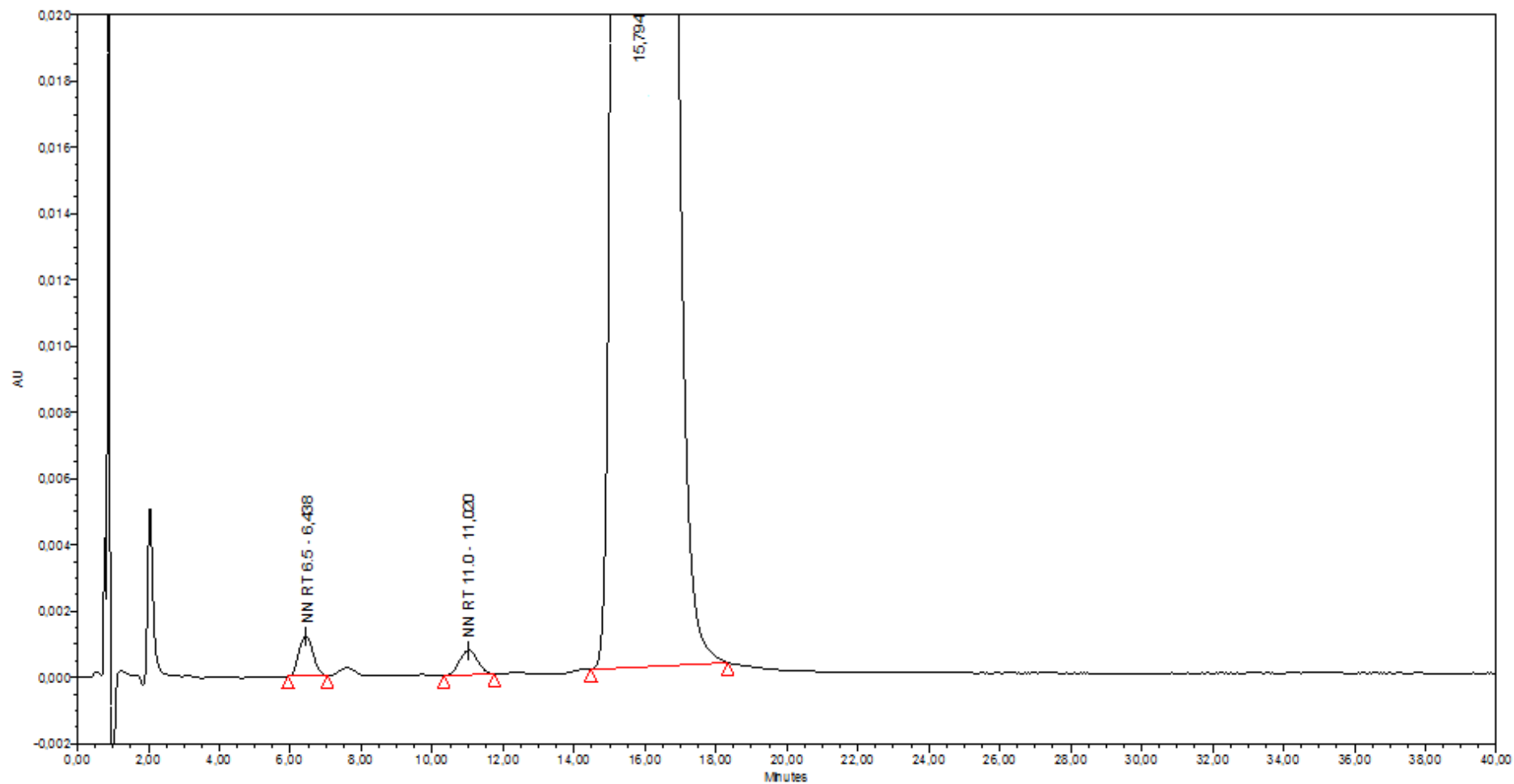
Farebne označená sledovaná neznáma nečistota v API



Obrázok 3.19 Chromatogram šarže 1 vzorky 1 finálnej liekovej formy



Obrázok 3.20 Chromatogram šarže 2 vzorky 1 finálnej liekovej formy



Obrázok 3.21 Chromatogram šarže 1 vzorky 1 API „Y“

Účinná látka je citlivá na svetlo a podlieha degradácii, tak bol predpoklad, že finálna lieková forma by mohla podliehať pri nesprávnom skladovaní a manipulácii počas výroby a balenia rozkladu. Na overenie tejto hypotézy sa vyhovujúca šarža v originálnom balení na šesť dní vystavila pôsobeniu svetla. Tu však bol pozorovaný iba nárast známej nečistoty A, neznáma nečistota s RRT 0,41 zostala na tej istej hodnote 0,07 %, ako pri prepúšťaní šarže pred 3 mesiacmi. Vzorový chromatografický záznam uvádza Obrázok 3.22.

Na overenie degradácie bola vybratá predchádzajúca vyhovujúca šarža finálnej liekovej formy, a šarža API použitá na výrobu vyšetovaných dvoch šarží finálnej liekovej formy. Vyhovujúce hodnoty API boli overené opakovanou analýzou z protivzorky a aj vzorky zo skladu. Ako overovacie šarže boli analyzované vyhovujúce šarže finálnej liekovej formy a API, ktoré neboli vystavené pôsobeniu degradačných činidiel a záťaži.

Podrobný popis nastavenia experimentu a prídavkov pre finálnu liekovú formu a účinnú látku uvádzajú Tabuľka 3.5 a Tabuľka 3.6.

Tabuľka 3.5 Popis nastavenia experimentu pre finálnu liekovú formu

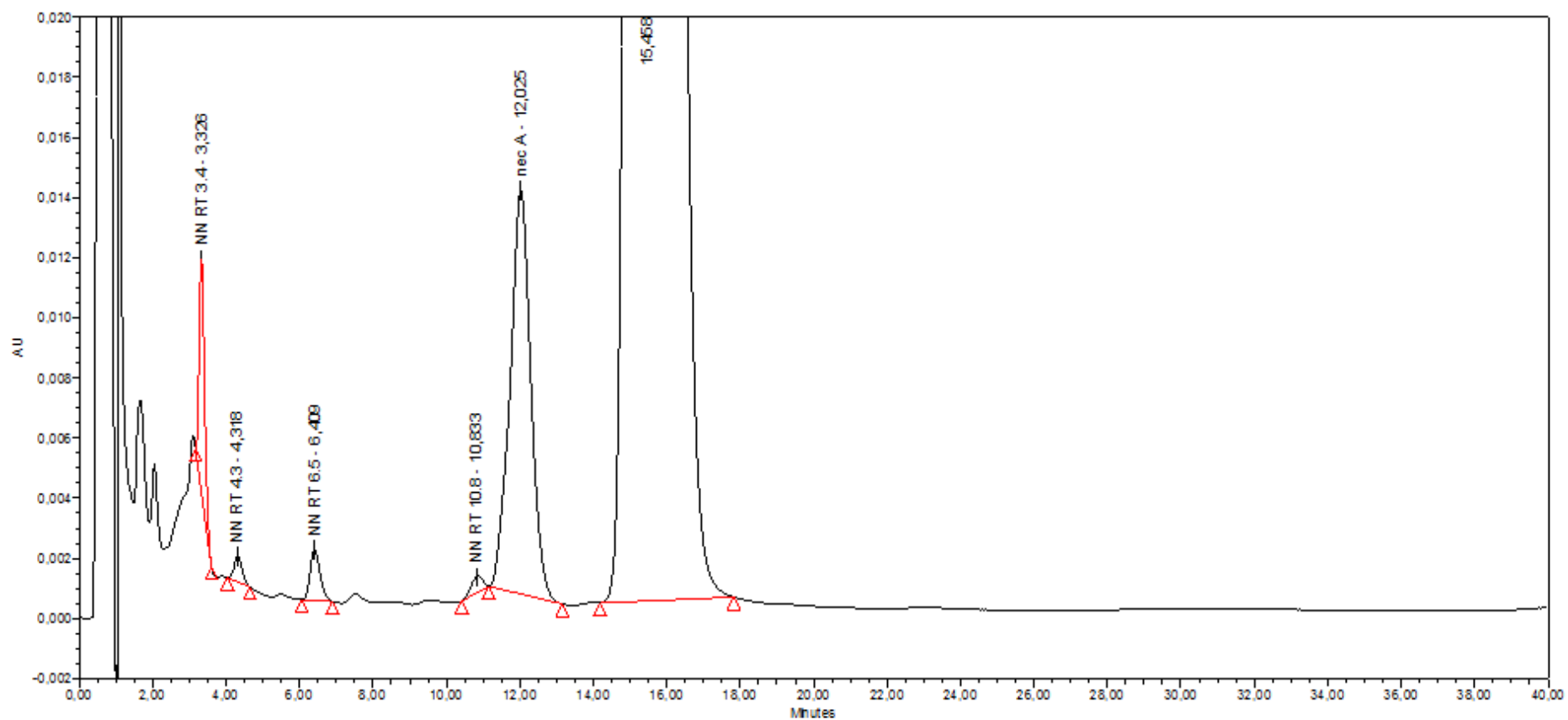
Finálna lieková forma	Teplota	Doba pôsobenia	Prídavok
šarža č. 3, vzorka č. 1	-18 °C	24 hod	–
šarža č. 3, vzorka č. 2	60 °C	24 hod	(10%) 1M HCl
šarža č. 3, vzorka č. 3	60 °C	24 hod	1M NaOH
šarža č. 3, vzorka č. 4	60 °C	24 hod	1M H ₂ O ₂

Tabuľka 3.6 Popis nastavenia experimentu pre API

API	Teplota	Doba pôsobenia	Prídavok
šarža č. 1, vzorka č. 1	60 °C	24 hod	(10%) 1M HCl
šarža č. 1, vzorka č. 2	60 °C	24 hod	1M NaOH
šarža č. 1, vzorka č. 3	60 °C	24 hod	1M H ₂ O ₂

Súbežne bolo zahájené overovanie vplyvu teplôt pod 0 °C a degradácie na finálnej liekovej forme ako aj vstupnej API pri pôsobení kyslého, zásaditého a oxidačného činidla. Z výsledkov, ktoré uvádzajú Tabuľka 3.7 a Tabuľka 3.8 vyplýva, že nárast nečistoty RRT 0,41 bol zaznamenaný ako pre analyzované vzorky finálnej liekovej formy (o 18 %), tak aj pre vzorku API (o 11 %) po pôsobení peroxidu vodíka. Chromatografické záznamy, vid' Obrázok 3.23 až Obrázok 3.30.

Vo vzorke finálnej liekovej formy bol navyše zaznamenaný významný nárast (o 39 %) nečistoty RRT 0,41 po pôsobení 1 M roztoku kyseliny chlorovodíkovej.



Obrázok 3.22 Chromatografický záznam vzorky finálnej liekovej formy vyhovujúcej šarže, ktorá bola analyzovaná po osvetlení šesť dní (hodnota neč. A — 1,9%), neč. RRT 0,41 — 0,07% (rovnako ako pri finálnej analýze)

Tabuľka 3.7 Výsledky analýz simulácie degradácie pre finálnu liekovú formu

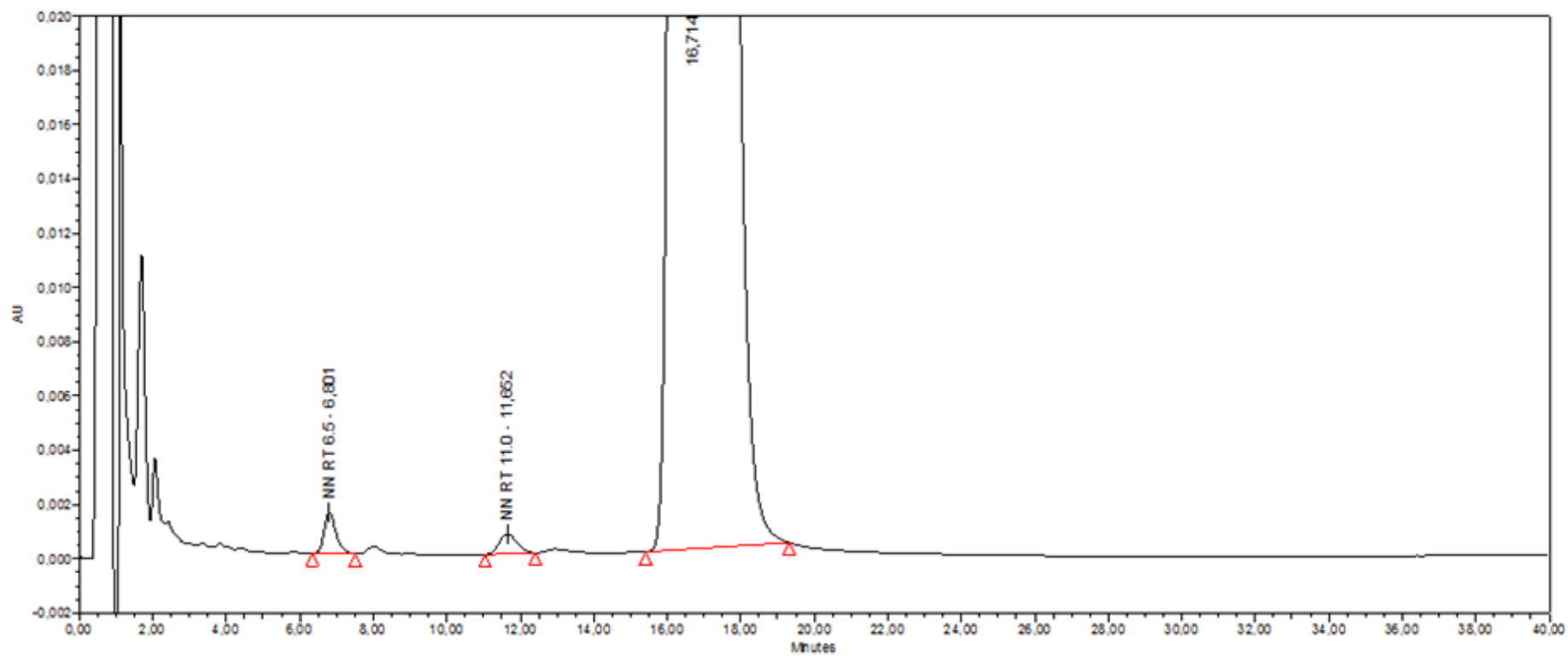
Finálna lieková forma	nečistota RRT 0,20 [%]	nečistota RRT 0,30 [%]	nečistota RRT 0,34 [%]	nečistota RRT 0,41 [%]	nečistota RRT 0,70 [%]	nečistota A RRT 0,78 [%]	nečistota RRT 0,86 [%]	nečistota RRT 2,05 [%]
šarža č. 3	n.d.	n.d.	n.d.	0,074	0,058	n.d.	n.d.	n.d.
šarža č. 3, vzorka č. 1	n.d.	n.d.	n.d.	0,076	0,056	n.d.	n.d.	n.d.
šarža č. 3, vzorka č.2	n.d.	n.d.	n.d.	0,103	0,064	0,084	n.d.	n.d.
šarža č. 3, vzorka č. 3	n.d.	0,296	1,483	n.d.	0,096	n.d.	0,393	0,600
šarža č. 3, vzorka č. 4	0,044	0,028	n.d.	0,088	0,067	0,275	n.d.	n.d.

Farebne označené: sledovaná neznáma nečistota a výsledky nad limit špecifikácie pre neznáme nečistoty — max. 0,1 %

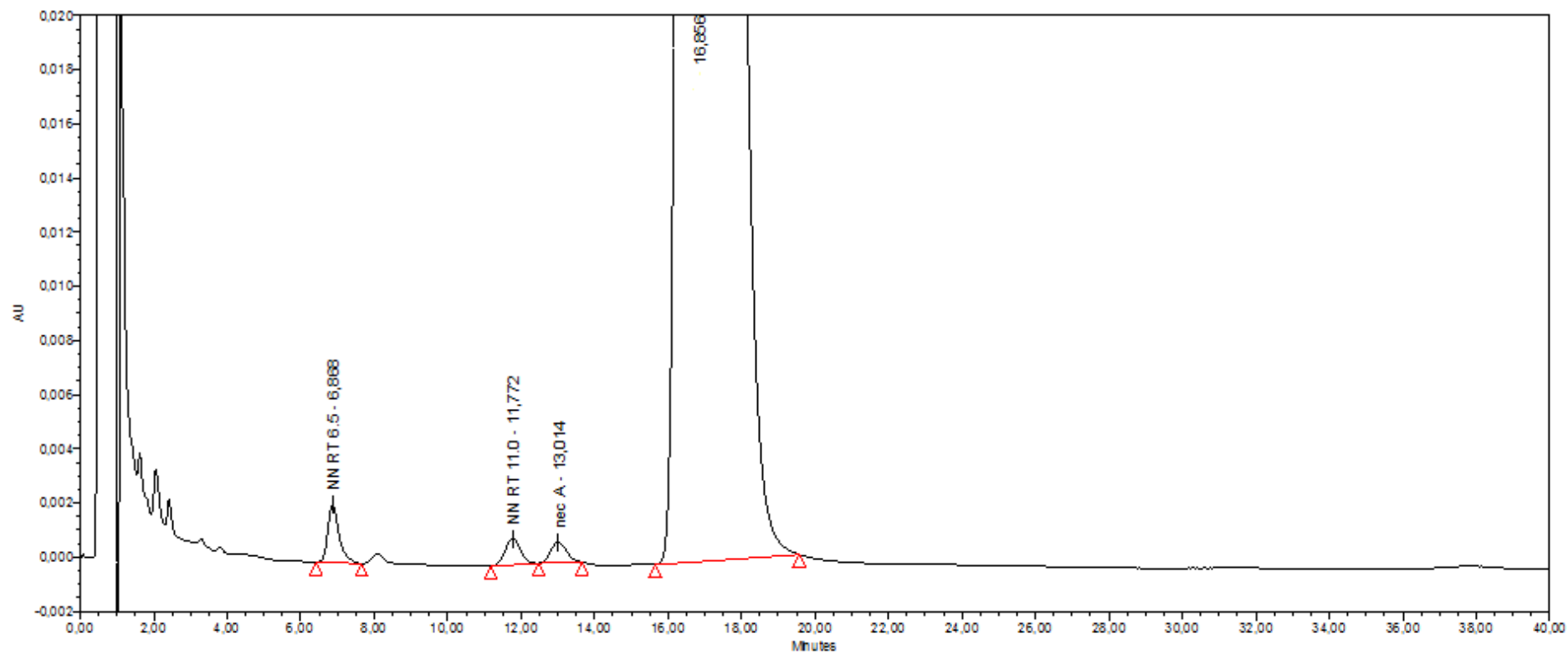
Tabuľka 3.8 Výsledky analýz simulácie degradácie pre API „Y“

API	nečistota RRT 0,20 [%]	nečistota RRT 0,30 [%]	nečistota RRT 0,34 [%]	nečistota RRT 0,41 [%]	nečistota RRT 0,70 [%]	nečistota A RRT 0,78 [%]
šarža č. 1	n.d.	n.d.	n.d.	0,079	0,062	n.d.
šarža č. 1, vzorka č.1	n.d.	n.d.	n.d.	0,071	0,053	0,043
šarža č. 1, vzorka č. 2	n.d.	n.d.	n.d.	0,034	0,025	n.d.
šarža č. 1, vzorka č. 3	0,038	0,033	0,026	0,088	0,044	0,688

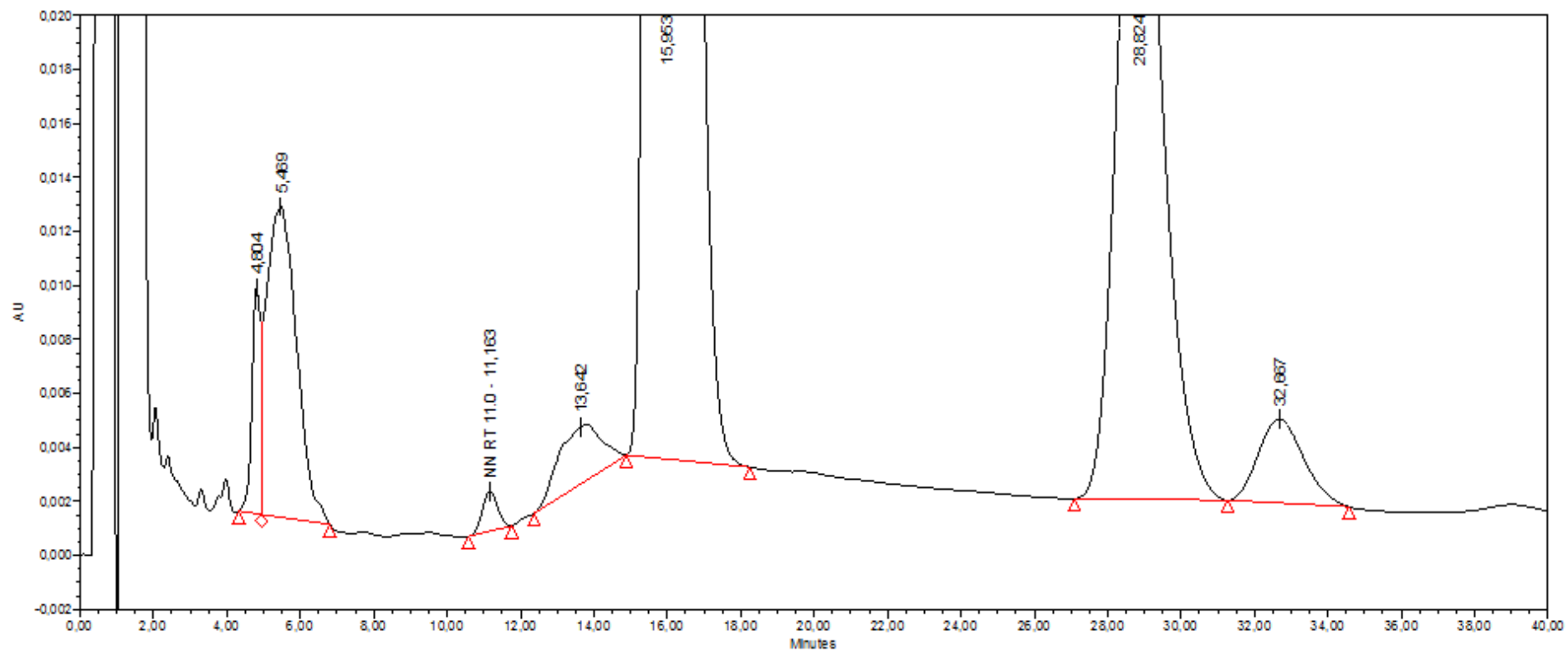
Farebne označené: sledovaná neznáma nečistota a výsledky nad limit špecifikácie pre neznáme nečistoty — max. 0,1 %



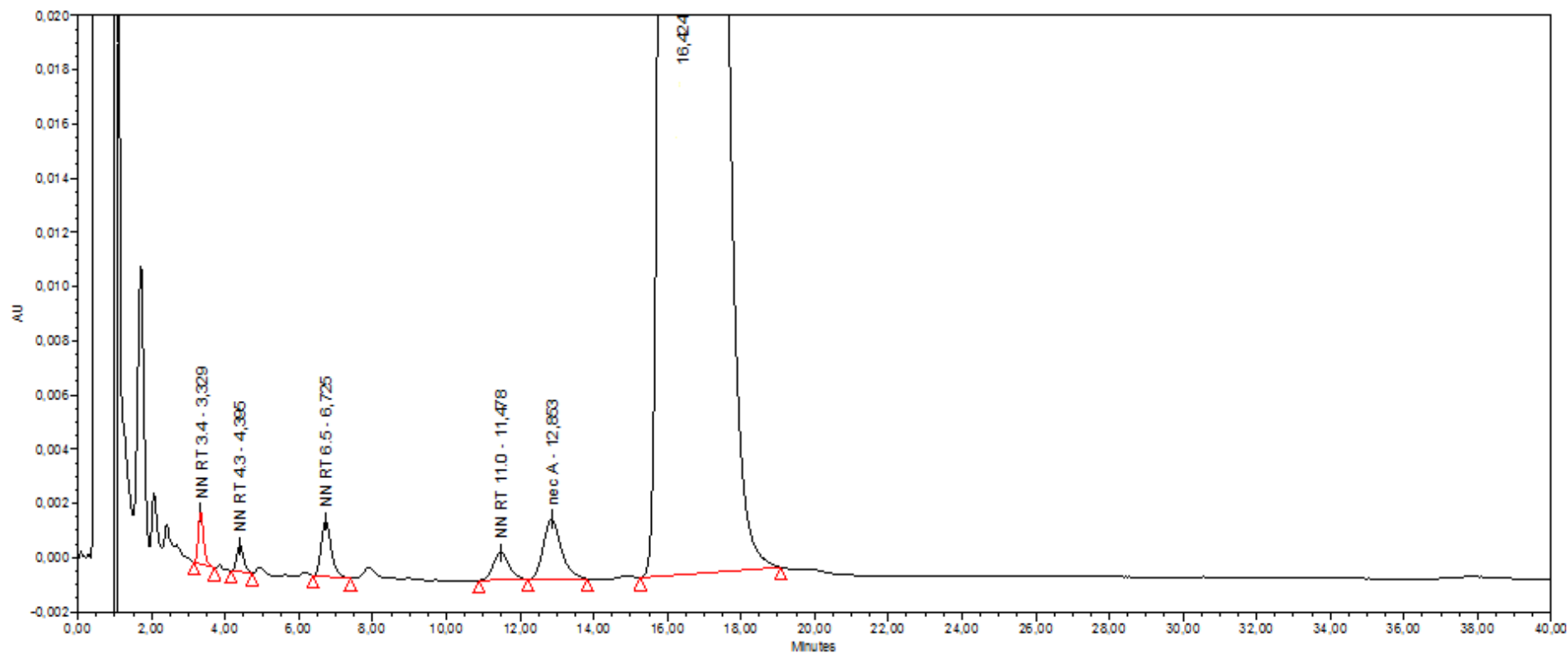
Obrázok 3.23 Chromatografický záznam simulácie degradácie finálnej liekovej formy (šarža č. 3, vzorka č. 1)



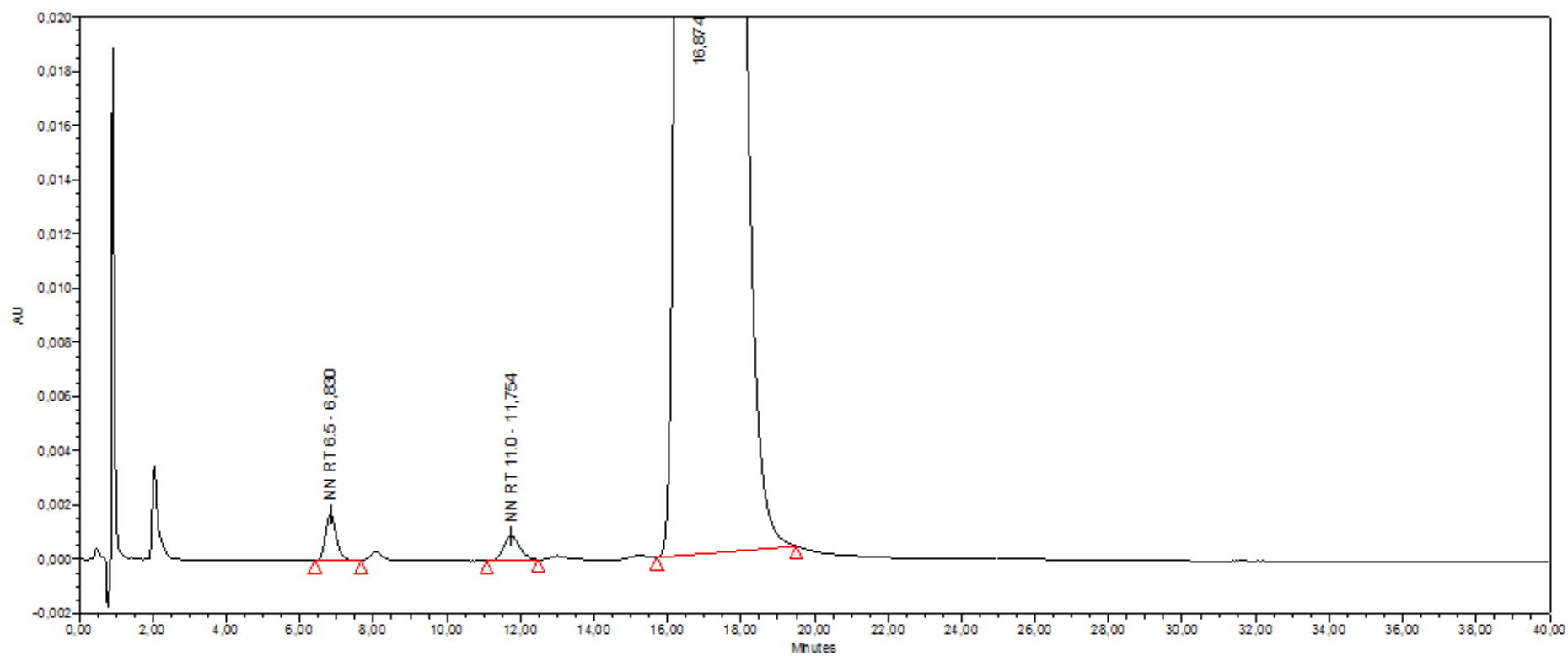
Obrázok 3.24 Chromatografický záznam simulácie degradácie finálnej liekovej formy (šarža č. 3, vzorka č. 2)



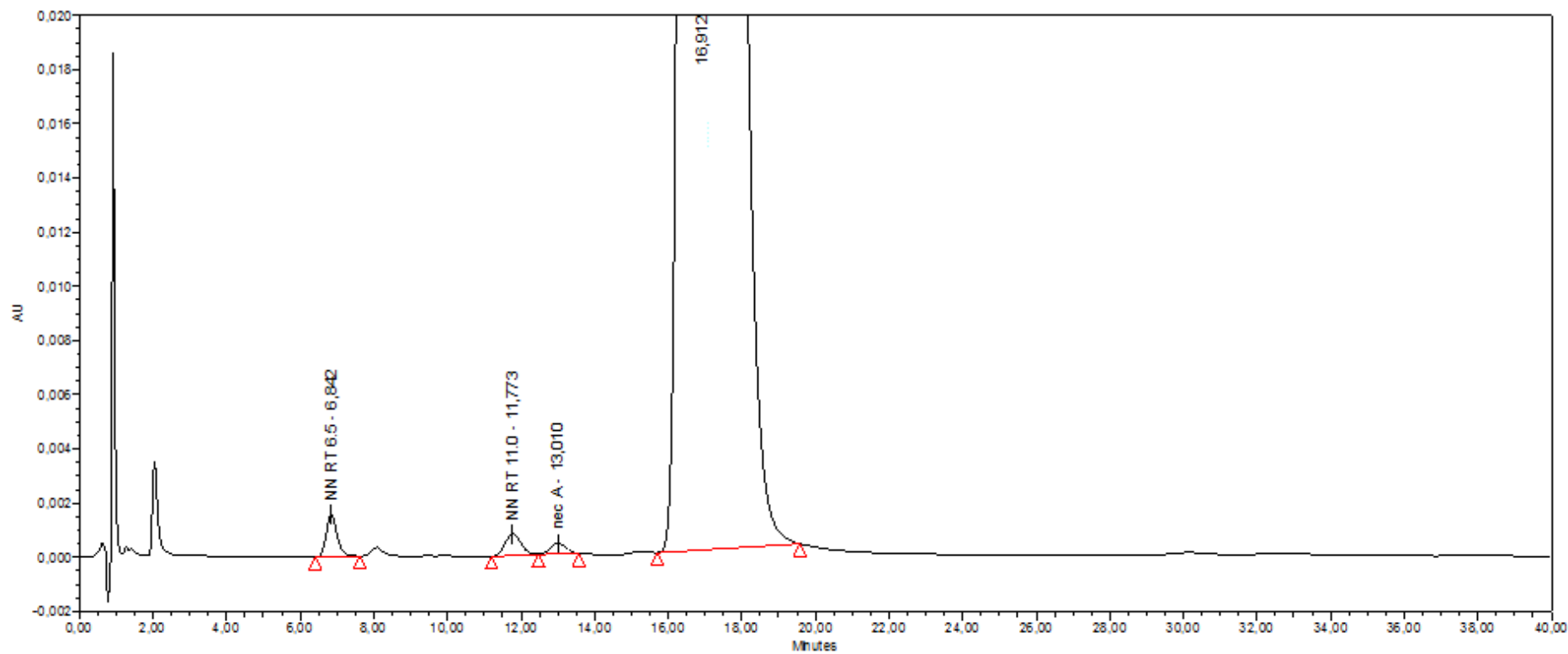
Obrázok 3.25 Chromatografický záznam simulácie degradácie finálnej liekovej formy (šarža č. 3, vzorka č. 3)



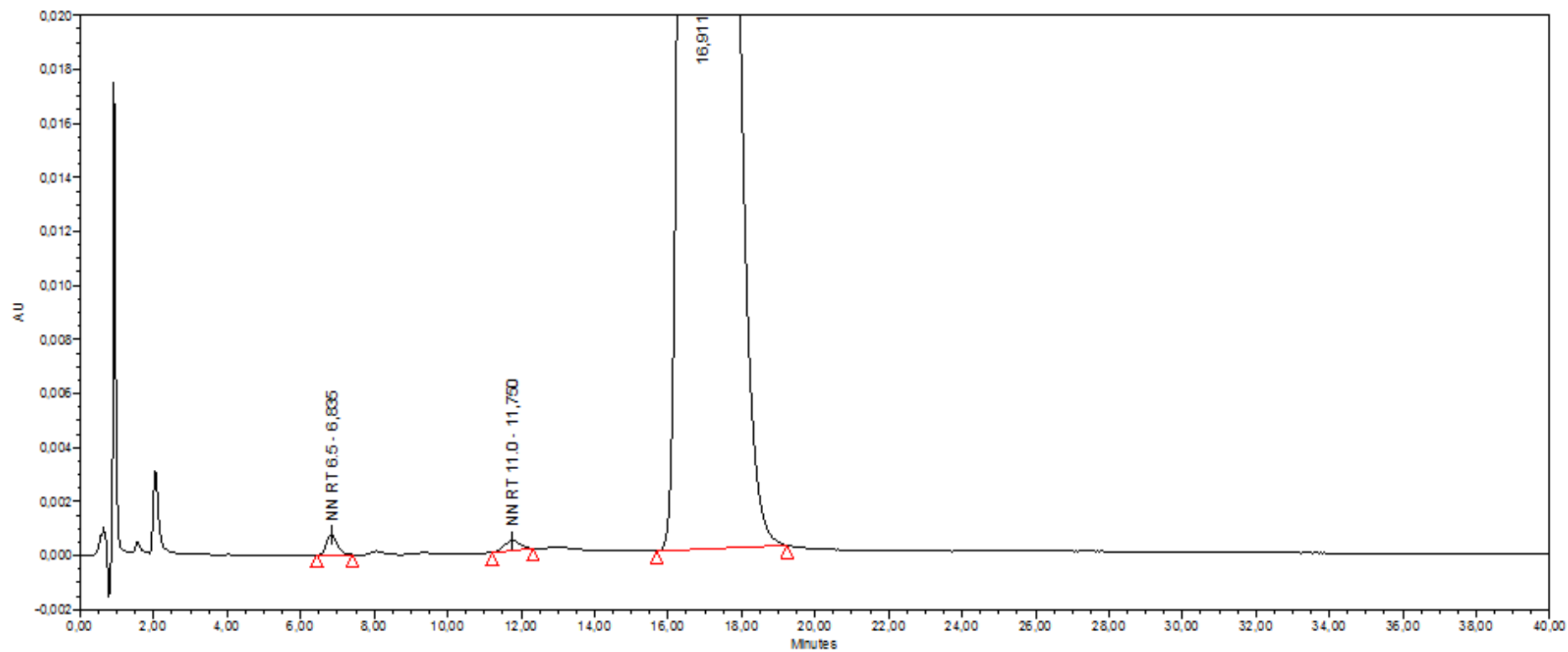
Obrázok 3.26 Chromatografický záznam simulácie degradácie finálnej liekovej formy (šarža č. 3, vzorka č. 4)



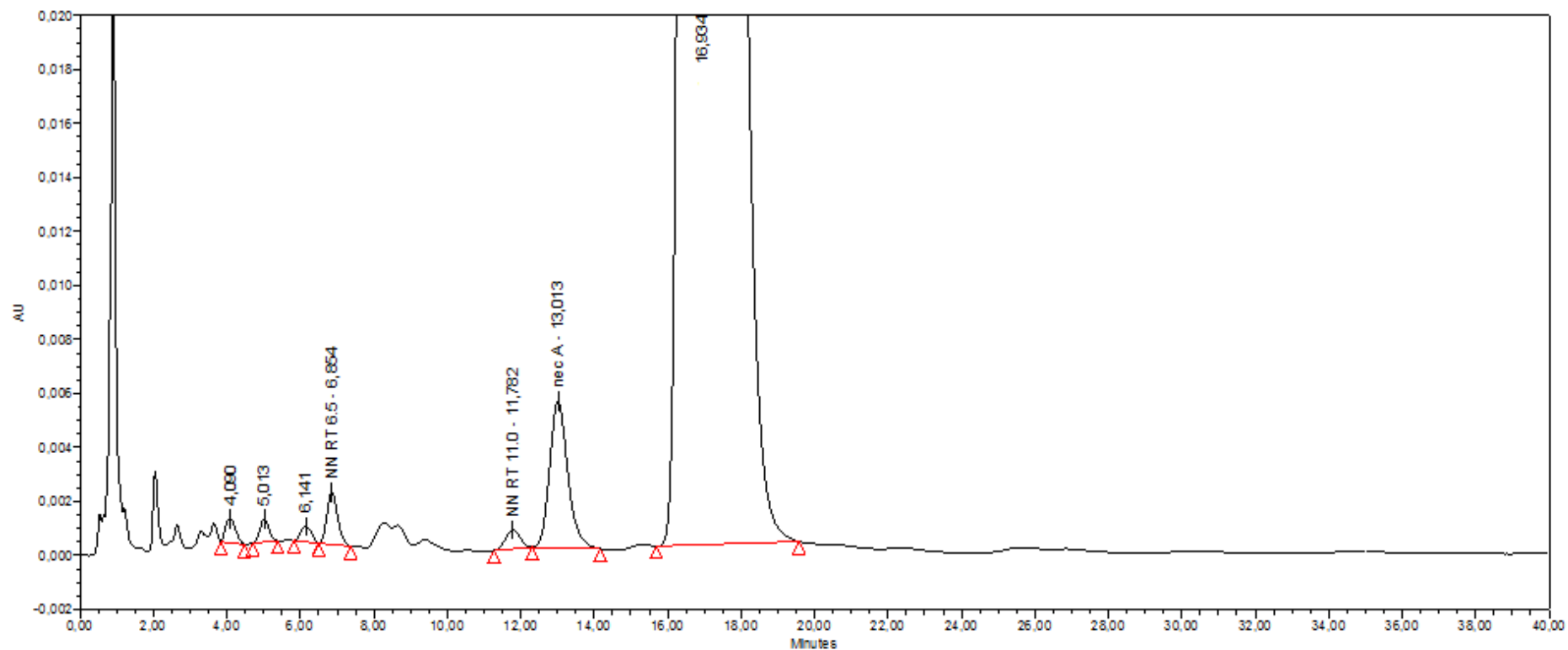
Obrázok 3.27 Chromatografický záznam simulácie degradácie API „Y“ overovacia šarža (šarža č. 1)



Obrázok 3.28 Chromatografický záznam simulácie degradácie API „Y“ (šarža č. 1, vzorka č.1)



Obrázok 3.29 Chromatografický záznam simulácie degradácie API „Y“ (šarža č. 1, vzorka č.2)

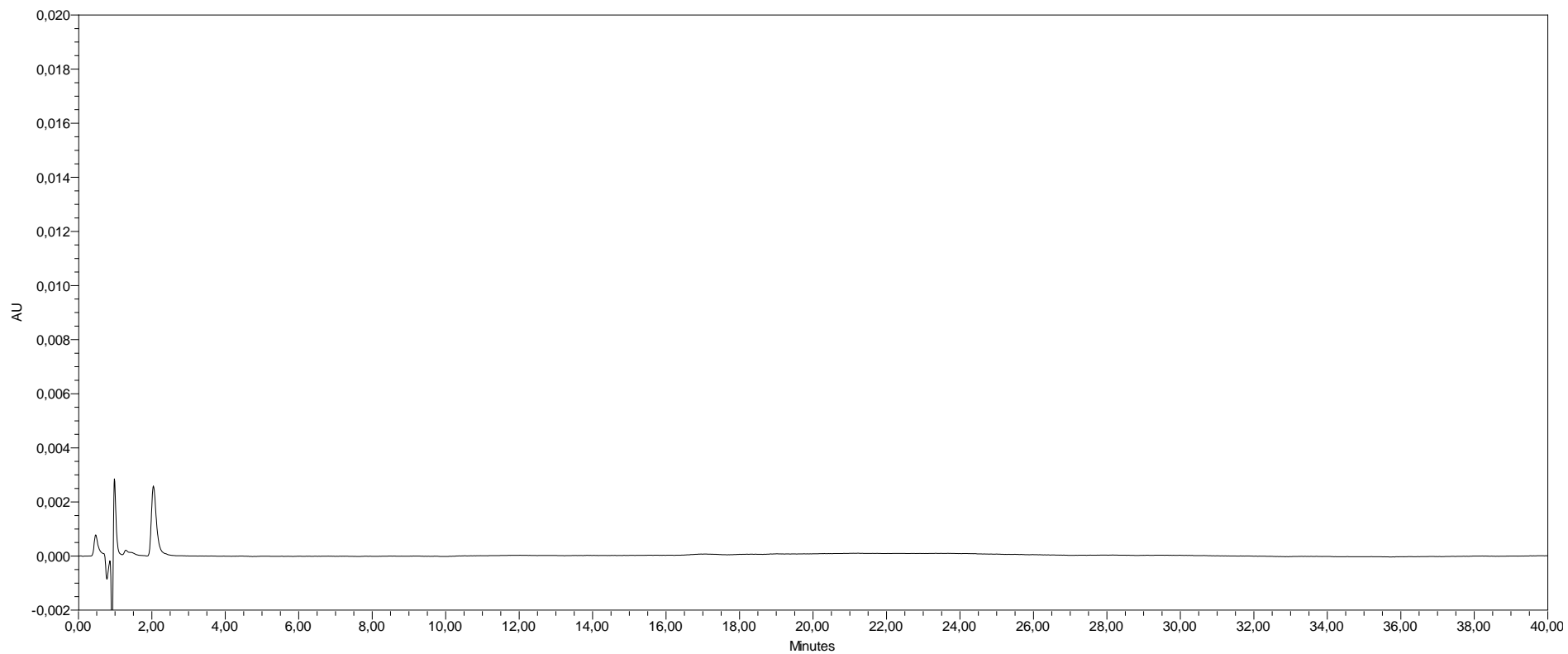


Obrázok 3.30 Chromatografický záznam simulácie degradácie API „Y“ (šarža č. 1, vzorka č.3)

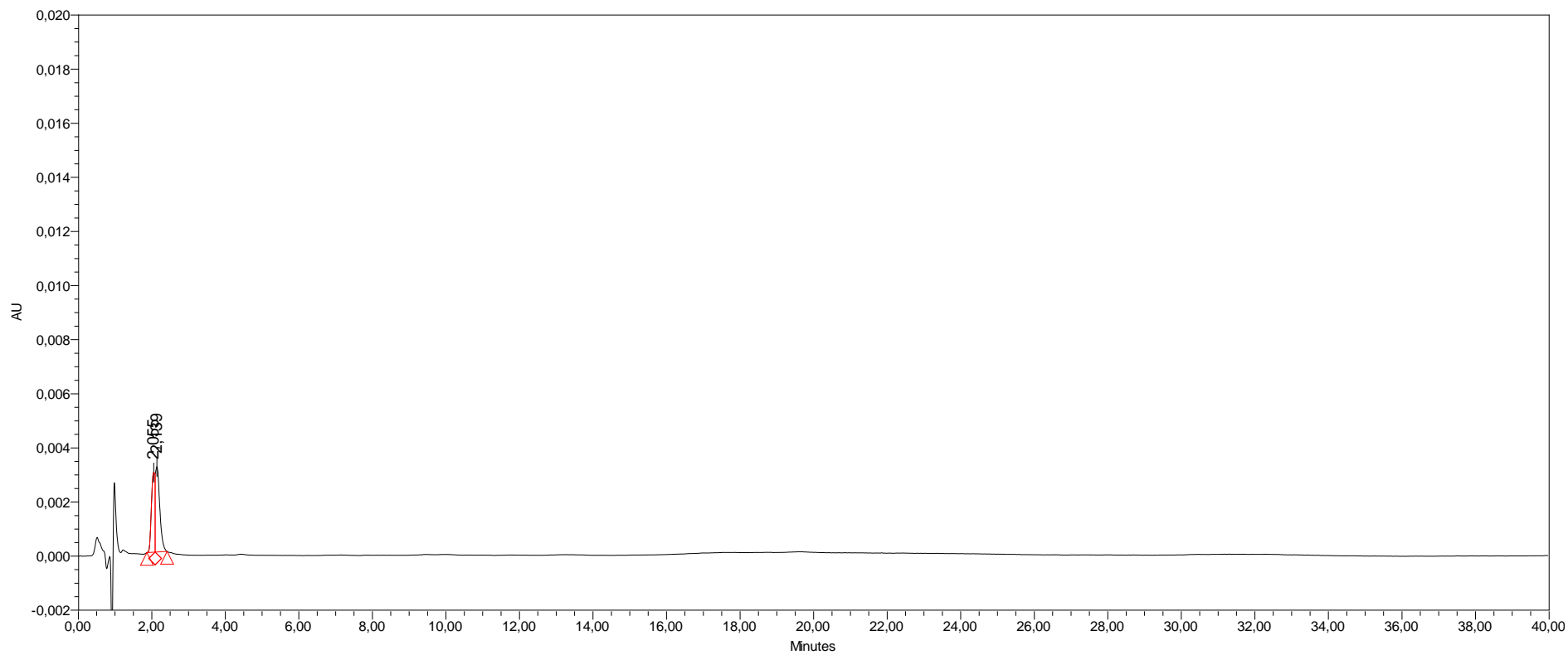
Vzhľadom na vyššie uvedené závery, boli počas vyšetovania preverované ďalšie vzorky finálnej liekovej formy, primárne obaly (zátky, fľašky) a používané dezinfekčné prostriedky, ako aj excipienty a API použitéj v predchádzajúcom prípravku, aby bola vylúčená kontaminácia z predchádzajúcej výroby.

Excipienty a API z predchádzajúceho prípravku — overovanie krížovej kontaminácie

Boli pripravené 0,2 % roztoky pomocných látok (edetán disodný, citrónan sodný, makrogol 400) vzhľadom na koncentráciu API „Y“ vo vyšetrovanej finálnej liekovej forme. Analyzované boli metódou HPLC predpísanou pre finálnu liekovú formu. Boli hľadané možné píky, ktoré by eluovali v podobných RRT ako vyšetovaná neznáma nečistota RRT 0,41. Avšak, žiadna analyzovaná vzorka pomocných látok ani API použitá v predchádzajúcom prípravku nevykazovala v danom RRT pík. Vzorové chromatogramy uvádza Obrázok 3.31 a Obrázok 3.32.



Obrázok 3.31 Chromatografický záznam 0,2% roztoku edetanu disodného — pík pochádza z mobilnej fázy (excipient používaný do finálnej liekovej formy)



Obrázok 3.32 Chromatografický záznam 0,2% roztoku citronanu sodného (pomocná surovina, ktorá sa používa do finálnej liekovej formy)

Vplyv dezinfekčných prostriedkov

Vzorky dezinfekčných prostriedkov boli použité bez riedenia. Výsledky analýzy metódou HPLC predpísanej pre stanovenie finálnej liekovej formy uvádza Tabuľka 3.9.

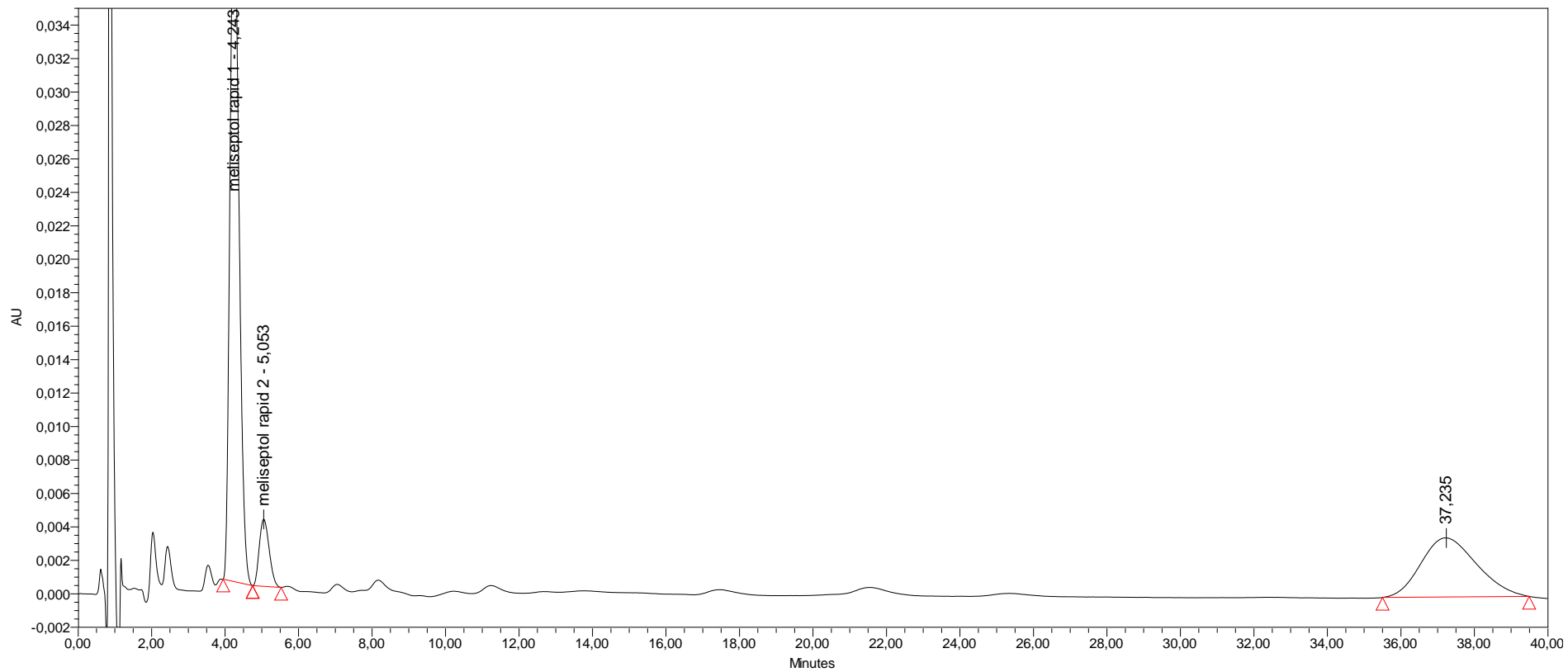
Tabuľka 3.9 Výsledky analýzy metódou HPLC vzoriek dezinfekčných prostriedkov

	Nečistota						
	RRT 0,19	RRT 0,22	RRT 0,26	RRT 0,32	RRT 0,50	RRT 0,71	RRT 0,82
Incidur spray	0,05 %	0,05 %	0,06 %	0,04 %	0,10 %	0,04 %	0,10 %
isopropanol	RRT 0,12						
	0,48 %						
Aerodisin	RRT 0,31	RRT 0,44	RRT 0,51	RRT 0,64	RRT 0,70		
	0,09 %	0,02 %	0,07 %	0,11 %	0,29 %		
Spitaderm	RRT 0,26	RRT 0,34	RRT 0,36				
	0,20 %	0,35 %	0,73 %				
1% Spitaderm	RRT 0,13	RRT 0,20	RRT 0,28				
	0,05 %	0,01 %	0,01 %				
Meliseptol rapid	RRT 0,26	RRT 0,31					
	3,91 %	0,22 %					
1% Incidin rapid	RRT 0,27	RRT 0,44					
	0,02 %	0,01 %					
0,2% Incidur	RRT 0,15	RRT 0,23	RRT 0,30				
	0,12 %	1,15 %	2,40 %				
Skinman soft	RRT 0,16						
	0,45 %						
oplach fliaš	RRT 0,30						
	0,002 %						
výluh zo zátok	RRT 0,13	(plocha 100 cm ² / 100 ml vody)					
	0,03 %						

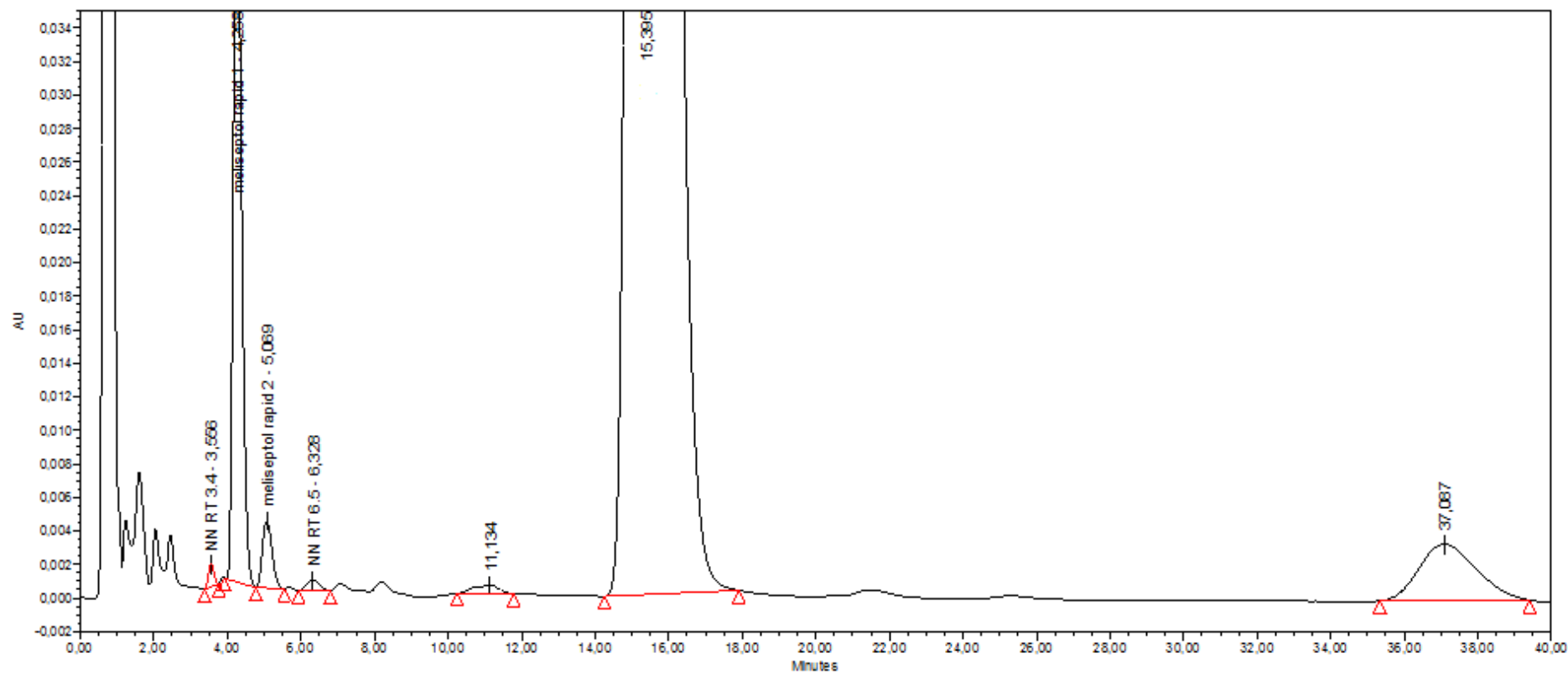
Farebne označené: sledovaná neznáma nečistota

Z výsledkov, ktoré uvádza Tabuľka 3.9 je vidieť, že niektoré dezinfekčné prostriedky, na rozdiel od vyššie uvádzaných excipientov a účinnej látky z predchádzajúceho prípravku, vykazujú píky s významnou odozvou. Priložené chromatogramy s nástrekom nasledujúcich látok uvádza Obrázok 3.33 až Obrázok 3.36:

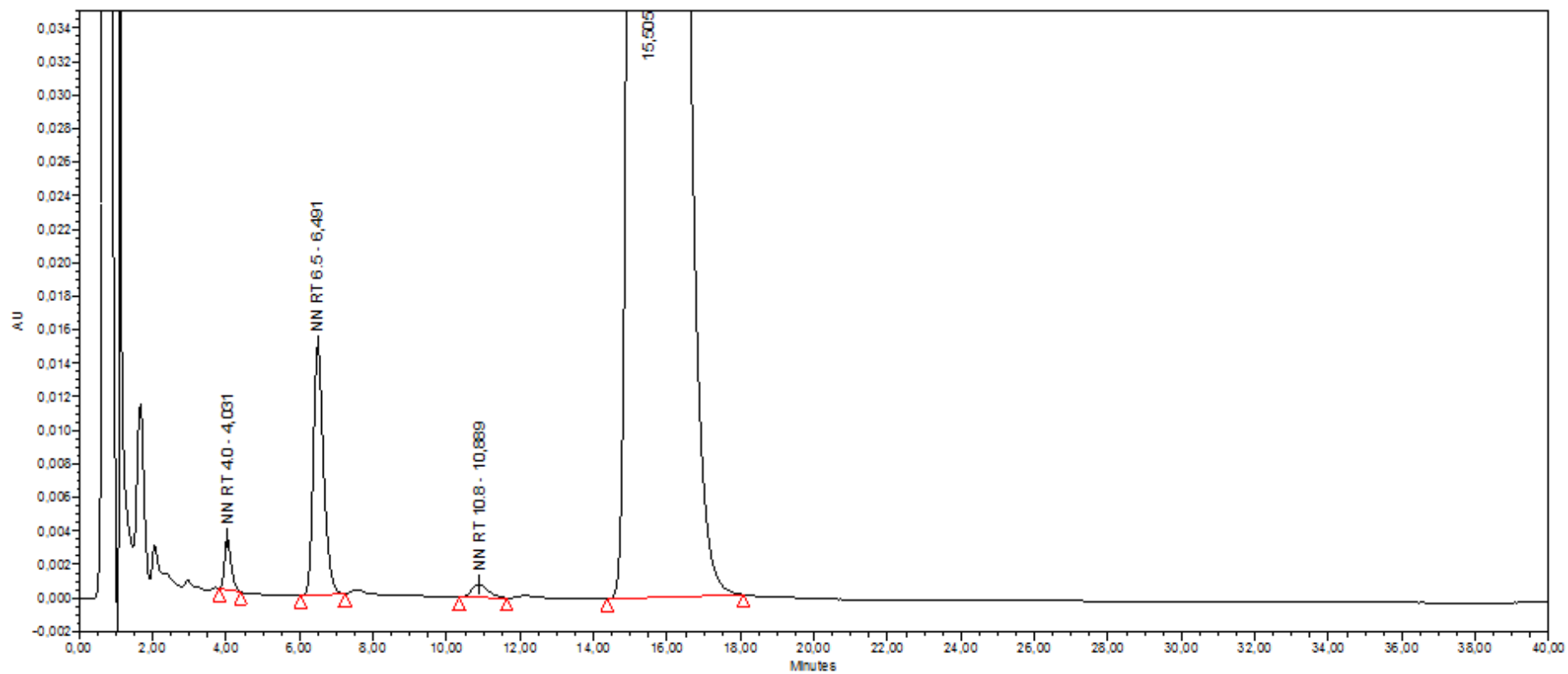
- Meliseptol rapid,
- finálna lieková forma šarža č.3 + prídavok Meliseptol rapid analýza po 24 hod,
- finálna lieková forma šarža č.1,
- finálna lieková forma šarža č.1 + prídavok Meliseptol rapid analýza po 24 hod



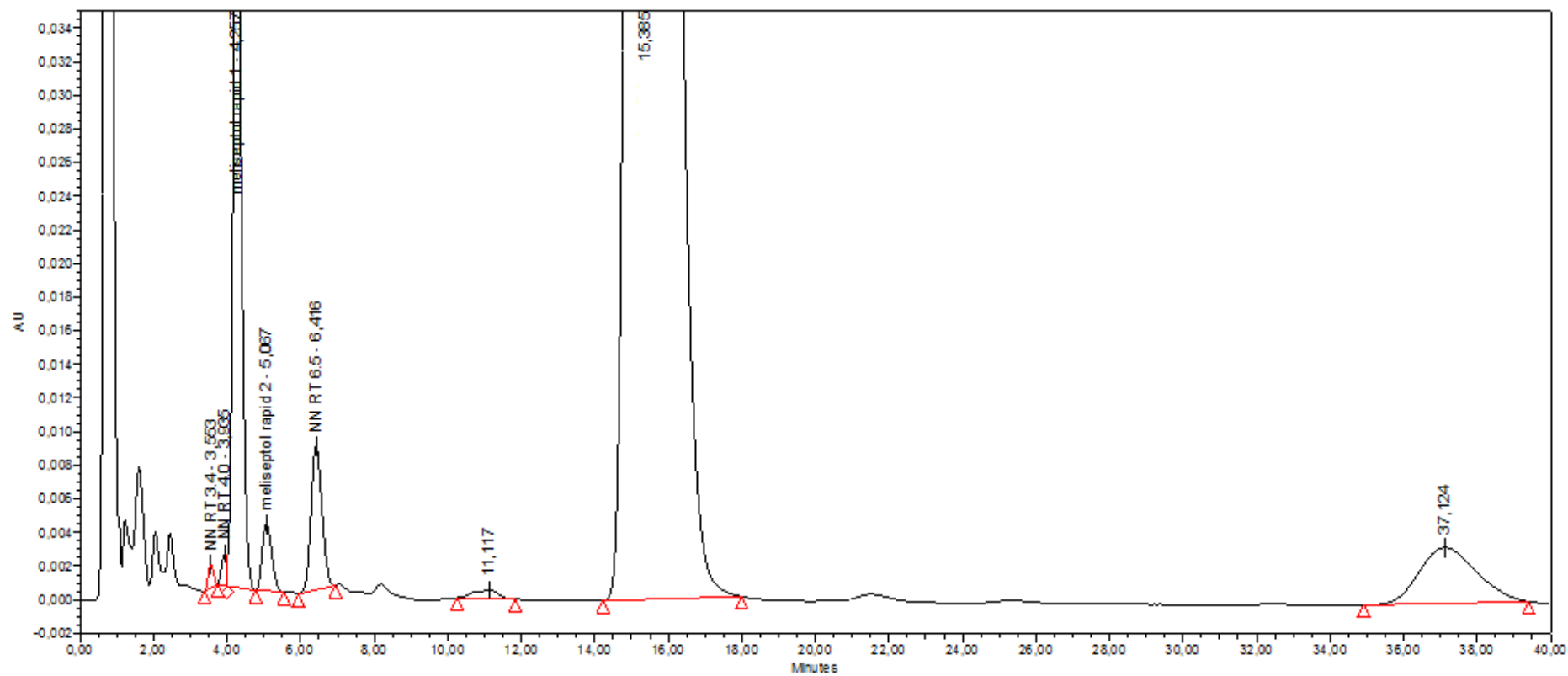
Obrázok 3.33 Chromatografický záznam dezinfekčného prostriedku Meliseptol rapid



Obrázok 3.34 Chromatografický záznam finálnej liekovej formy šarža č.3 + prídavok Meliseptol rapid analýza po 24 hod



Obrázok 3.35 Chromatografický záznam finálnej liekovej formy šarža č.1



Obrázok 3.36 Chromatografický záznam finálnej liekovej formy šarža č.1 + prídavok Meliseptol rapid analýza po 24 hod

Ako vidieť na zväčšení preložených chromatografických záznamoch vid' Obrázok 3.37 pík ďalšej neznámej nečistoty RRT 0,26 (RT 4,031min) z finálnej liekovej formy šarža 1, eluuje tesne pred prvým píkom pochádzajúcim z Meliseptolu (RT 4,243 min). Táto nečistota RRT 0,26 bola stanovená iba vo vyšetovaných šaržiach 1 a 2 finálnej liekovej formy, vo vyhovujúcich šaržiach finálnej liekovej formy nebola dovedy nikdy táto nečistota detegovaná. Táto nová neznáma nečistota RRT 0,26 však na rozdiel od neznámej nečistoty RRT 0,41 v oboch prípravkoch s časom nerastie.

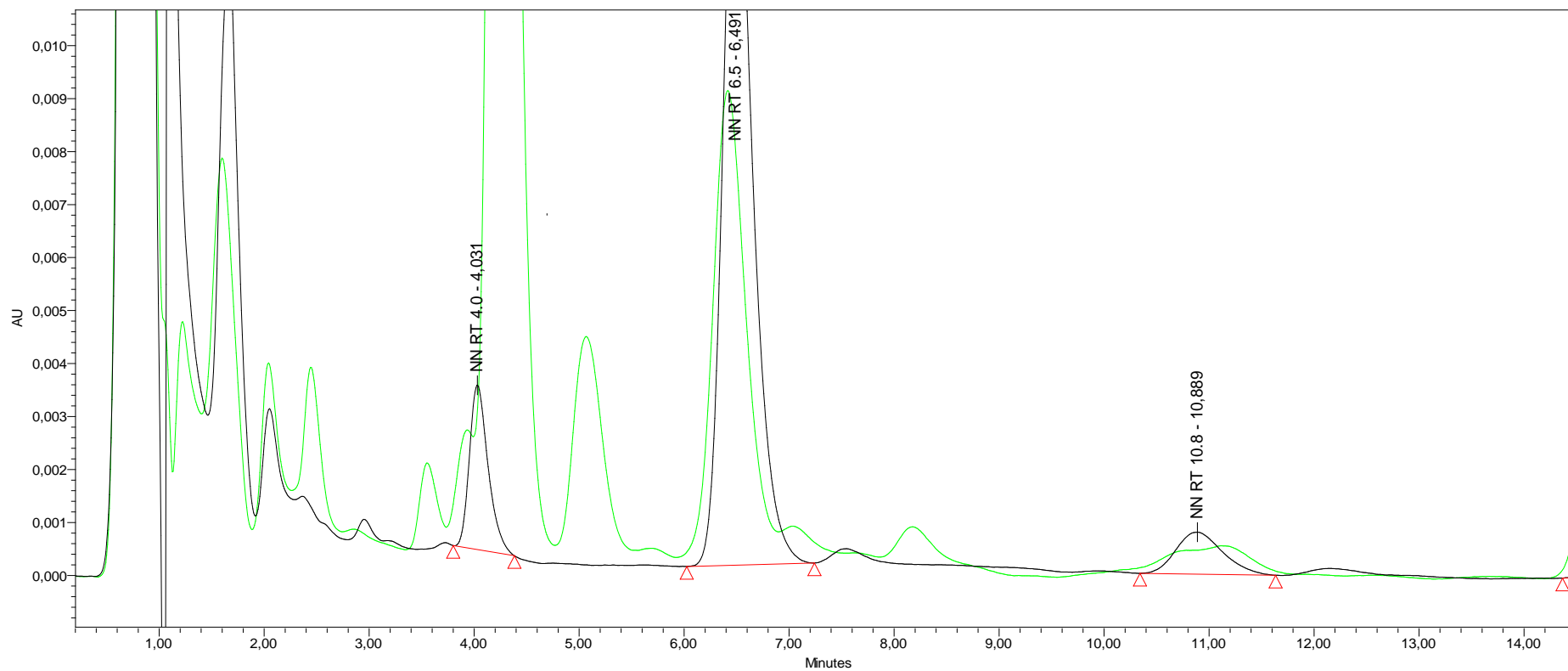
V liekovej forme šarža 3, ktorá bola použitá ako porovnávacía, rovnako s prídavkom Meliseptolu rapid 24 hod pred analýzou je vidieť iba samotný pík Meliseptolu a pík s RRT 0,26 (RT 4,031 min), ktorý sa nevyskytoval ani v pôvodnej šarži 3, nedáva ani tu žiadny pík.

Rovnako nie je viditeľný nárast ani vyšetrovanej nečistoty s RRT 0,41 vplyvom prídavku Meliseptolu.

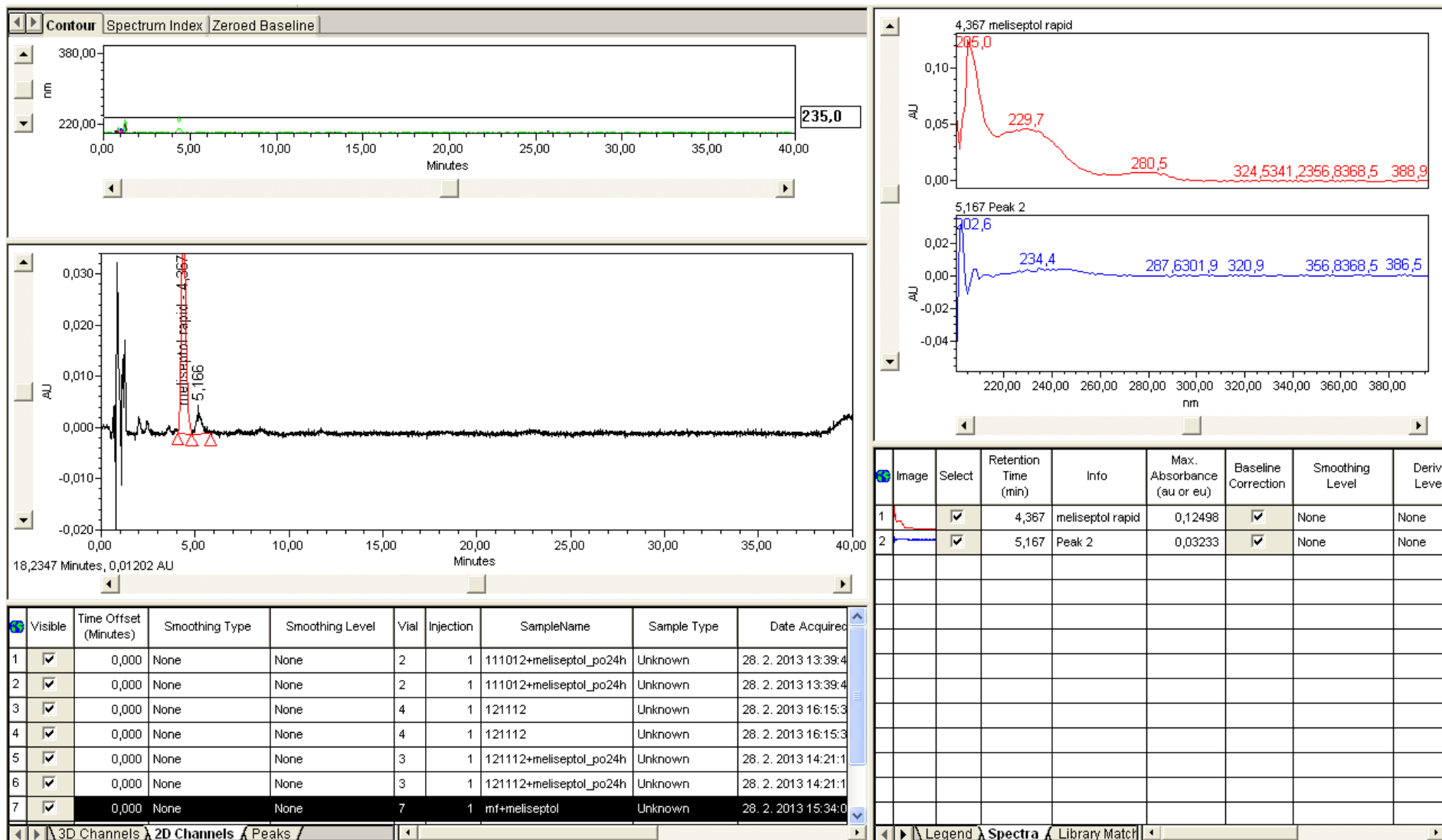
Pôsobenie Meliseptolu rapid na vyhovujúcu šaržu 3 finálnej liekovej formy nemal vplyv na nárast vyšetrovanej nevyhovujúcej nečistoty RRT 0,41. Týmto sa vylúčil vplyv tohto dezinfekčného prostriedku na nárast nečistoty RRT 0,41.

Vyhodnotením pomocou PDA detektora (spektra vid' Obrázok 3.38 — Obrázok 3.41) nedával tento pík pozitívnu zhodu s píkom Meliseptolu rapid, ktorý bol nastreknutý samostatne.

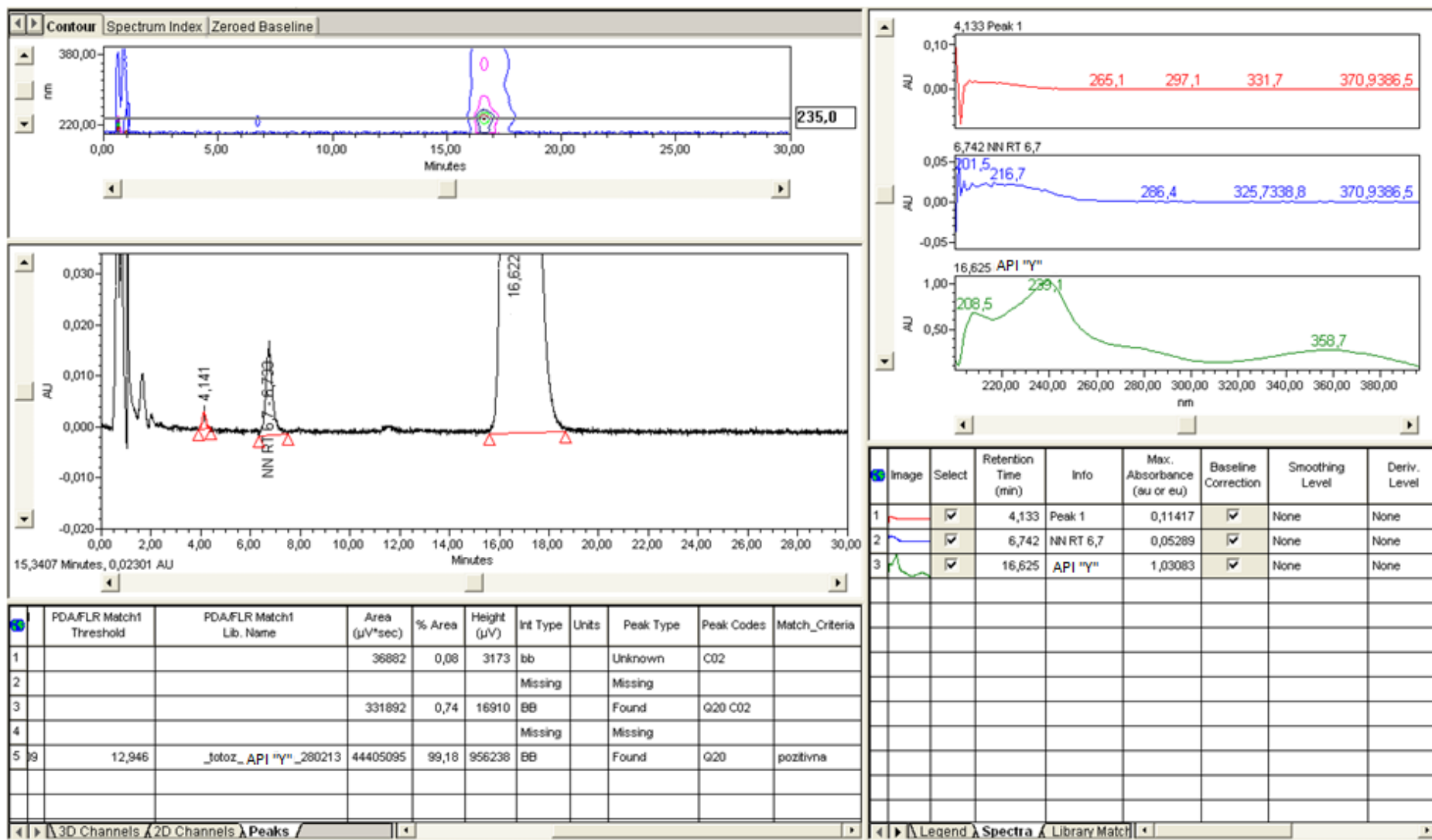
Podľa týchto výsledkov je zrejmé, že v dezinfekčnom prostriedku Meliseptol rapid je retenčný čas hlavného píku iba v zhodne blízkom retenčnom čase.



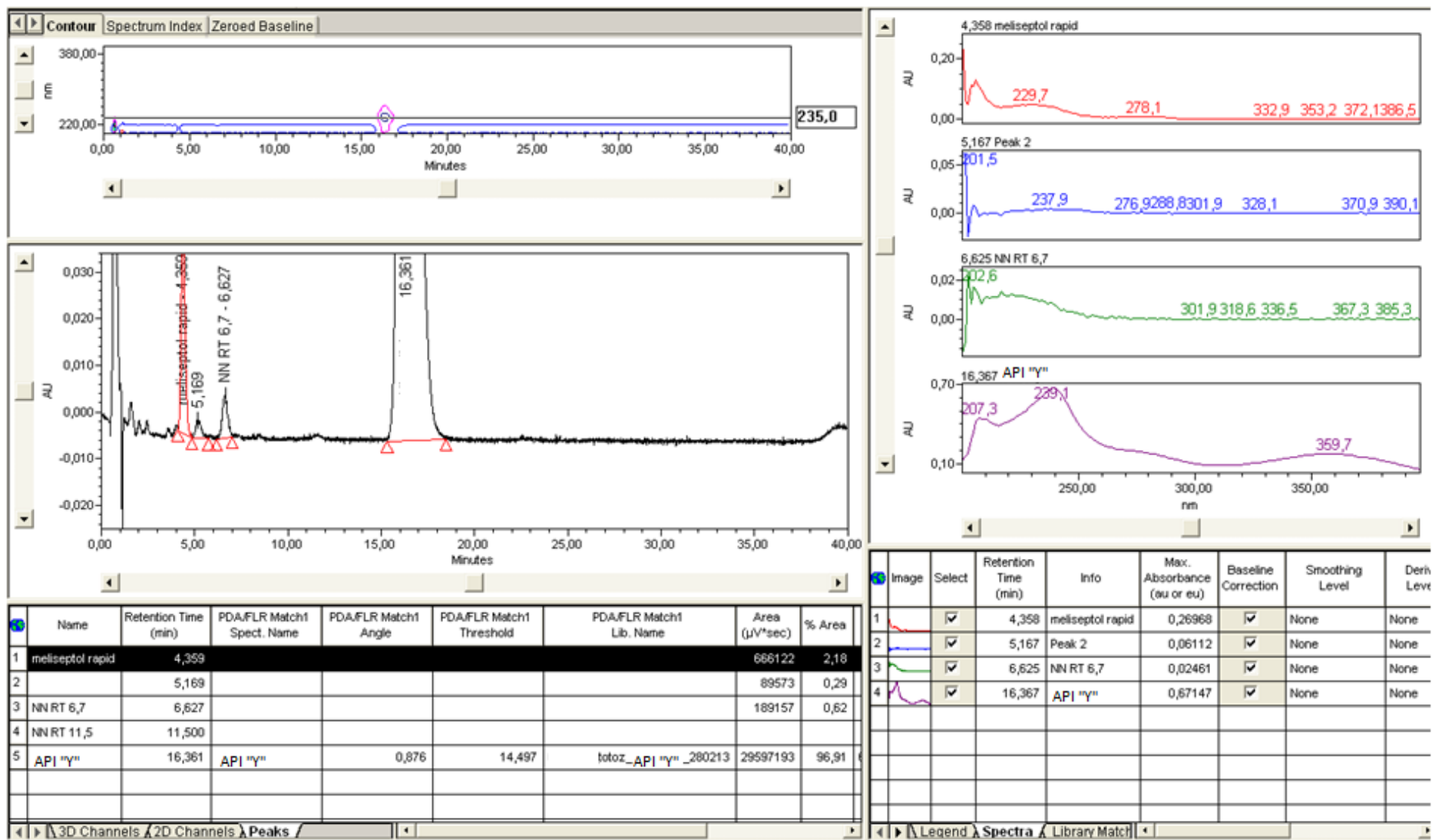
Obrázok 3.37 Preložené chromatografické záznamy finálnej liekovej formy šarža č. 1 (čierny) a finálnej liekovej formy šarža č. 1 + Meliseptol rapid (zelený)



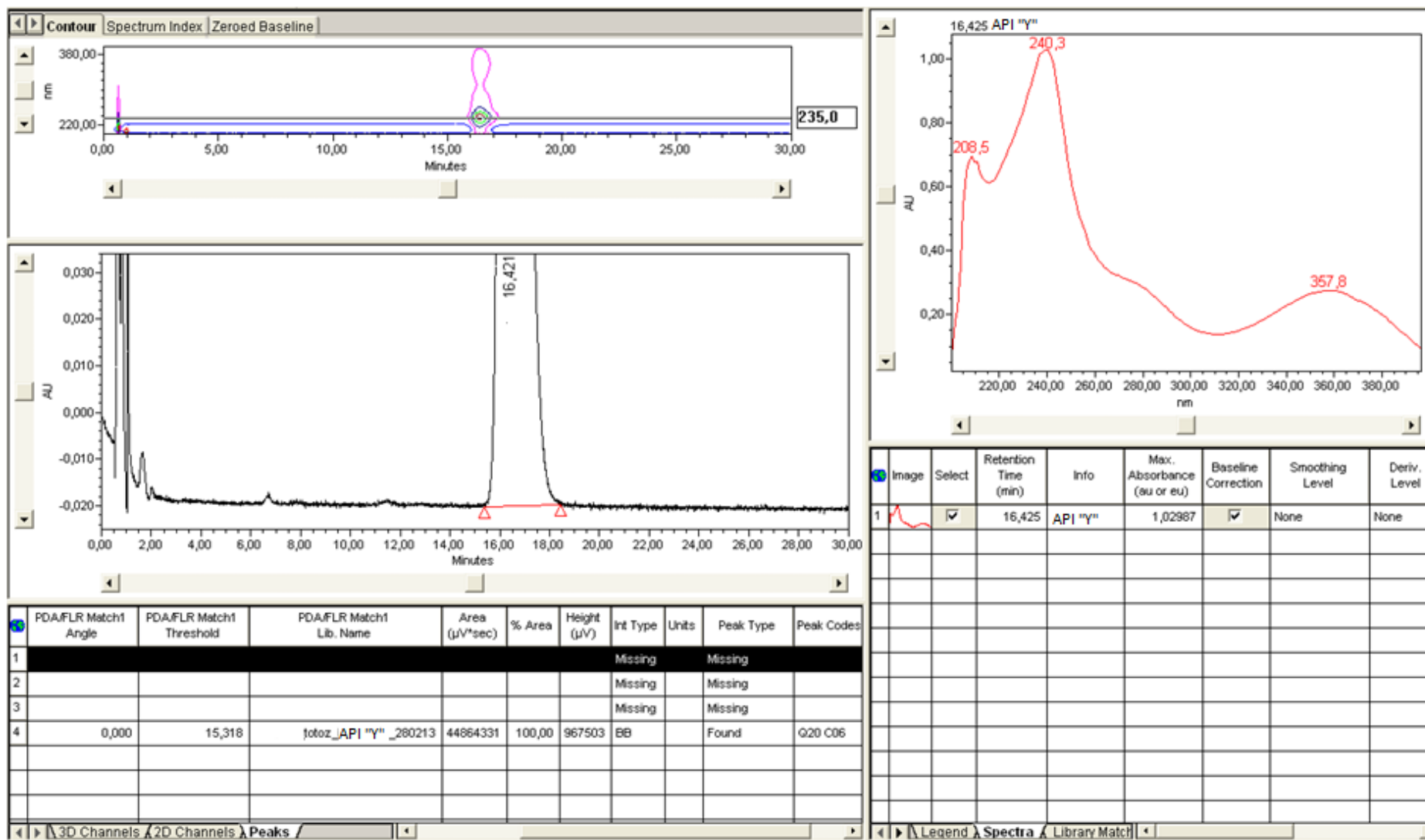
Obrázok 3.38 PDA spektrum Meliseptol rapid



Obrázok 3.39 PDA spektrum finálnej liekovej formy šarža č. 1



Obrázok 3.40 PDA spektrum finálnej liekovej formy šarža č. 1 + prídavok Meliseptol rapid



Obrázok 3.41 PDA spektrum finálnej liekovej formy šarža č. 3

Bol pozorovaný nárast neznámej nečistoty s RRT 0,41 v sledovaných šaržiach č. 1 a č. 2, po jednom mesiaci od prvej analýzy a porovnaný s vybranou porovnávacou šaržou č. 3 skladovanou za rovnakých podmienok (laboratórna teplota, bez prístupu svetla). Vyšetrované šarže vykazovali nárast sledovanej nečistoty RRT 0,41. Pri šarži č. 1 bol nárast z priemernej hodnoty 0,36 % na 0,56 % a u šarže č. 2 z priemernej hodnoty 0,24 % na 0,34 %. Prehľad výsledkov jednotlivých vzoriek uvádza Tabuľka 3.10.

Tabuľka 3.10 Nárast sledovanej neznámej nečistoty po 1 mesiaci

Finálna lieková forma analýza po 1 mesiaci	nečistota RRT 0,26 [%]	nečistota RRT 0,41 [%]	nečistota RRT 0,70 [%]	nečistota A RRT 0,78 [%]
porovnávací šarža č. 3	n.d.	0,072	0,056	n.d.
porovnávací šarža č. 3 + zátky	n.d.	0,072	0,056	n.d.
šarža č.1 začiatok	0,089	0,562	0,054	n.d.
šarža č. 1 -stred	0,089	0,561	0,054	n.d.
šarža č. 1 -koniec	0,089	0,562	0,053	n.d.
priemer šarža č. 1	0,089	0,0562	0,054	n.d.
šarža č. 2 začiatok	0,046	0,345	0,054	n.d.
šarža č. 2 -stred	0,047	0,344	0,053	n.d.
šarža č. 2 -koniec	0,046	0,344	0,054	n.d.
priemer šarža č. 2	0,046	0,344	0,054	n.d.

Farebne označené: sledovaná neznáma nečistota a výsledky nad limit špecifikácie pre neznáme nečistoty — max. 0,1 %

Podľa všetkých vyššie uvedených výsledkov a analýz vzoriek vyšetrovanej finálnej liekovej formy nevykazovali záťaž svetlom (po expozícii svetlom bol evidentný nárast nečistoty A — degradačný produkt), ktorá v týchto vyšetrovaných šaržiach nebola detegovaná.

Pomocné látky ani dezinfekčné prostriedky nevykazujú vplyv na vyšetrovanú neznámu nečistotu v uvádzaných RRT na finálnu liekovú formu.

Takisto je evidentné, že daná neznáma nečistota RRT 0,41 sa pred výrobou v použitej API nevyskytovala.

Všetky dostupné vzorky z vyšetrovaných obidvoch šarží vykazovali nárast vyšetrovanej nečistoty s RRT 0,41 po čase 1 mesiac od prvej analýzy.

Pôvodná vyhovujúca vzorka finálnej liekovej formy šarža 3 (porovnávací) skladovaná za rovnakých podmienok (otvorený pôvodný obal, laboratórna teplota, bez prístupu svetla) žiadny nárast oproti analýze pri prepúšťaní nevykazovala.

Vo finálnej liekovej forme šarže 2 a 3 je aj neznáma nečistota s RRT 0,26; ktorá sa doteraz v predchádzajúcich výrobných šaržiach nevyskytovala, takýto nárast v čase však nevykazuje.

Bolo zistené, že na generovanie neznámej nečistoty RRT 0,41 má vplyv 24 hodinová prítomnosť 1M roztoku peroxidu vodíka (v API „Y“ i vo finálnej liekovej forme) ako aj 1M roztok kyseliny chlorovodíkovej (iba vo finálnej liekovej forme). Neznáma nečistota RRT 0,26 týmto spôsobom však generovaná nebola.

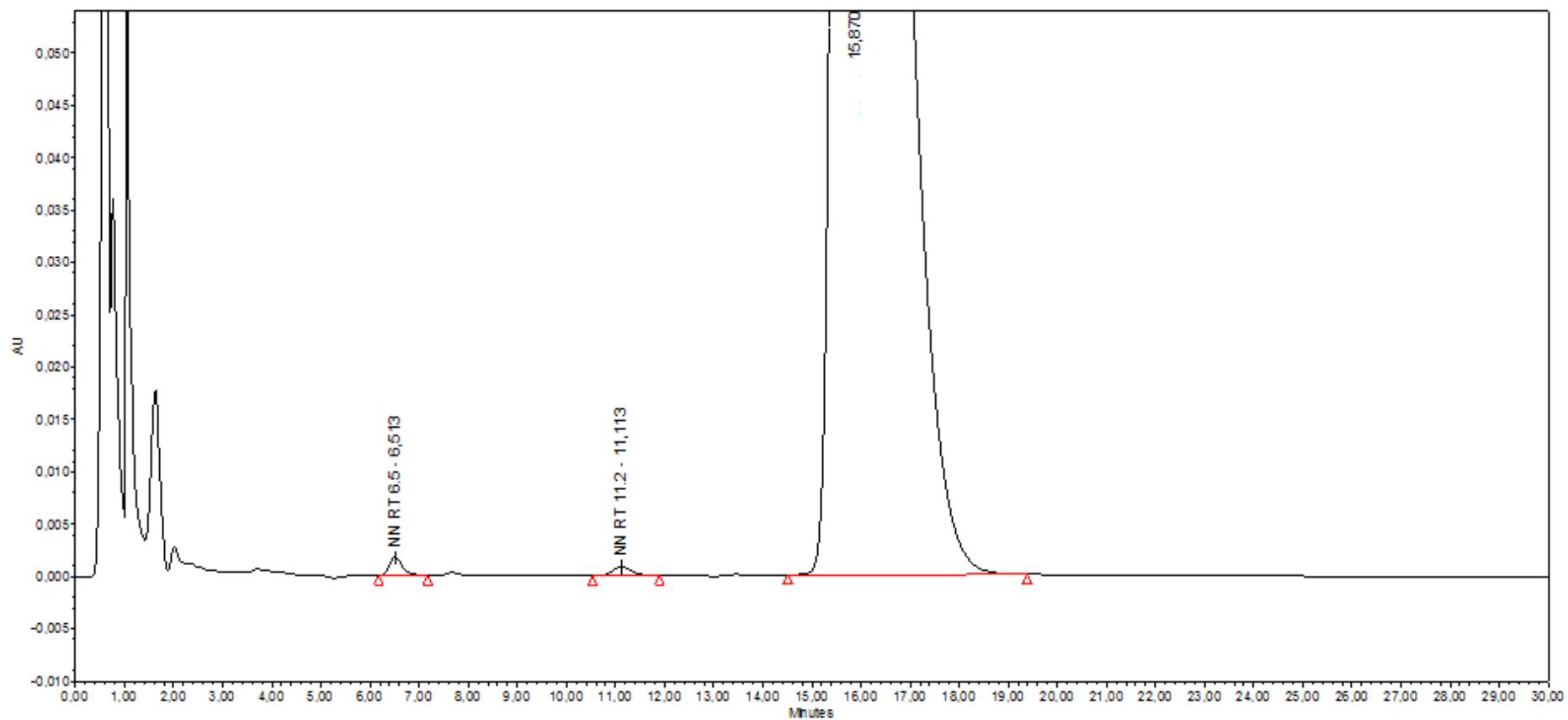
Na základe všetkých doteraz uskutočnených meraní nebolo možné určiť príčinu vzniknutého nevyhovujúceho výsledku. Preto bolo navrhnuté riešenie analyzovať vzorky metódou LC-HRMS.

Stanovenie neznámej nečistoty vo finálnej liekovej forme metódou LC-HRMS

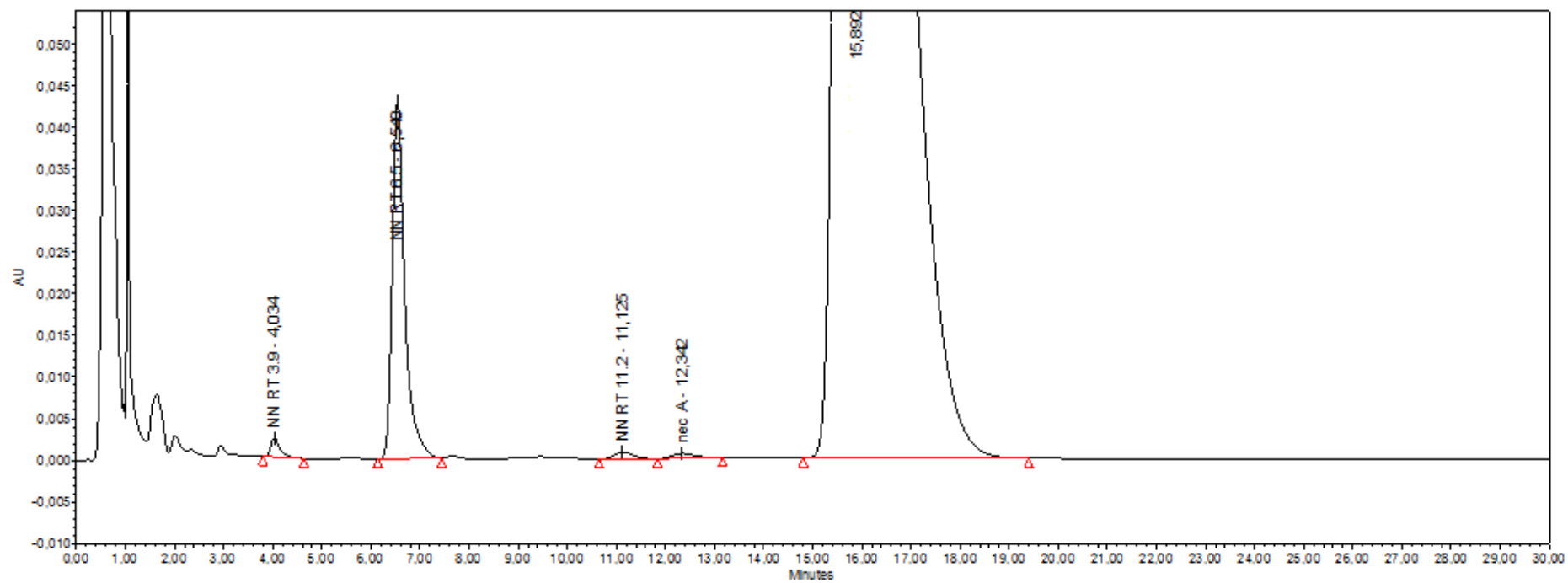
Paralelne s hodnotením a kvantifikáciou neznámych nečistôt bola prevádzaná identifikácia nečistôt. Na bližšie špecifikovanie nevyhovujúcej neznámej nečistoty RRT 0,41 metódou LC-HRMS sa použili vzorky finálnej liekovej formy šarží, ktoré mali pri analýze metódou HPLC vyhovujúce výsledky — šarža č. 1 a nevyhovujúce výsledky — šarža č. 3. Vzorky boli znovu analyzované v rovnakom čase pre potvrdenie presných výsledkov. A tieto hodnoty uvádza Tabuľka 3.11 a vzorové chromatografické záznamy Obrázok 3.42 a Obrázok 3.43.

Tabuľka 3.11 Stanovenie čistoty metódou HPLC vyhovujúcej a nevyhovujúcej šarže pred analýzou LC-HRMS

Finálna lieková forma	nečistota RRT 0,26 [%]	nečistota RRT 0,41 [%]	nečistota RRT 0,70 [%]	nečistota A RRT 0,78 [%]
porovnávací šarža č. 3	n.d.	0,072	0,052	n.d.
šarža č. 1	0,063	1,653	0,048	0,065



Obrázok 3.42 Chromatografický záznam finálnej liekovej formy pred analýzou LC-HRMS šarža č. 3



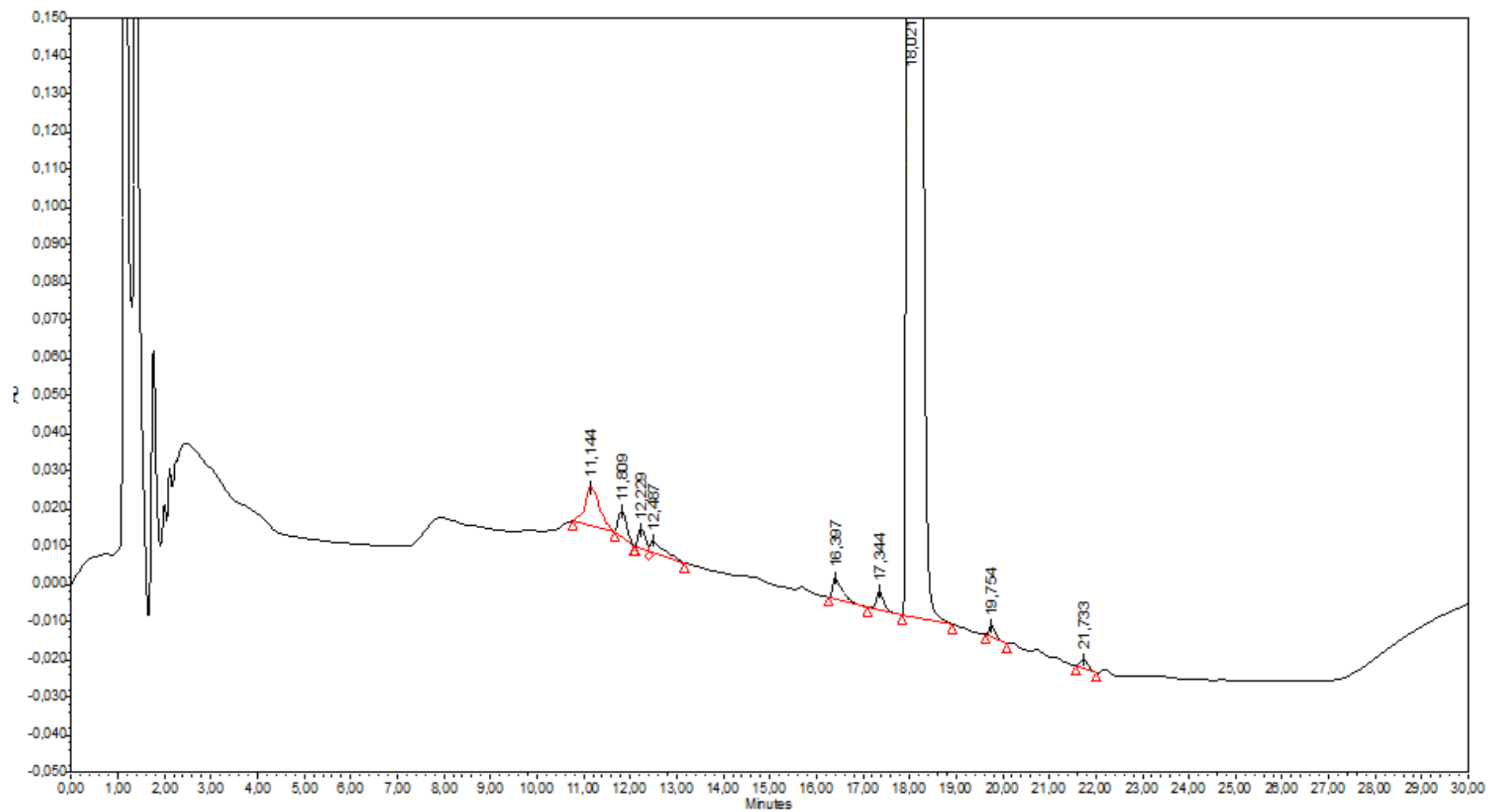
Obrázok 3.43 Chromatografický záznam finálnej liekovej formy pred analýzou LC-HRMS šarža č. 1

Podmienky analýzy metódou HPLC boli popísané vyššie. Chromatografické podmienky sa pre metódu LC-MS museli kvôli obsahu tetrahydrofuránu v mobilnej fáze mierne modifikovať a modifikácia bola nasledovná: reverzná kolóna: C18, 5 μm , 125 mm \times 4 mm ostala nezmenená, ale bol zmenený izokratický mód za gradientový, kde ako mobilná fáza A bol zvolený acetonitril, a ako mobilná fáza B 0,1% kyselina octová. Priebeh gradientu zobrazuje Tabuľka 3.12. Prietok bol znížený na 0,9 ml/min, detekcia bola 235 nm, ostal zachovaný nástrek vzorky 100 μl , teplota kolóny bola upravená na 30 $^{\circ}\text{C}$.

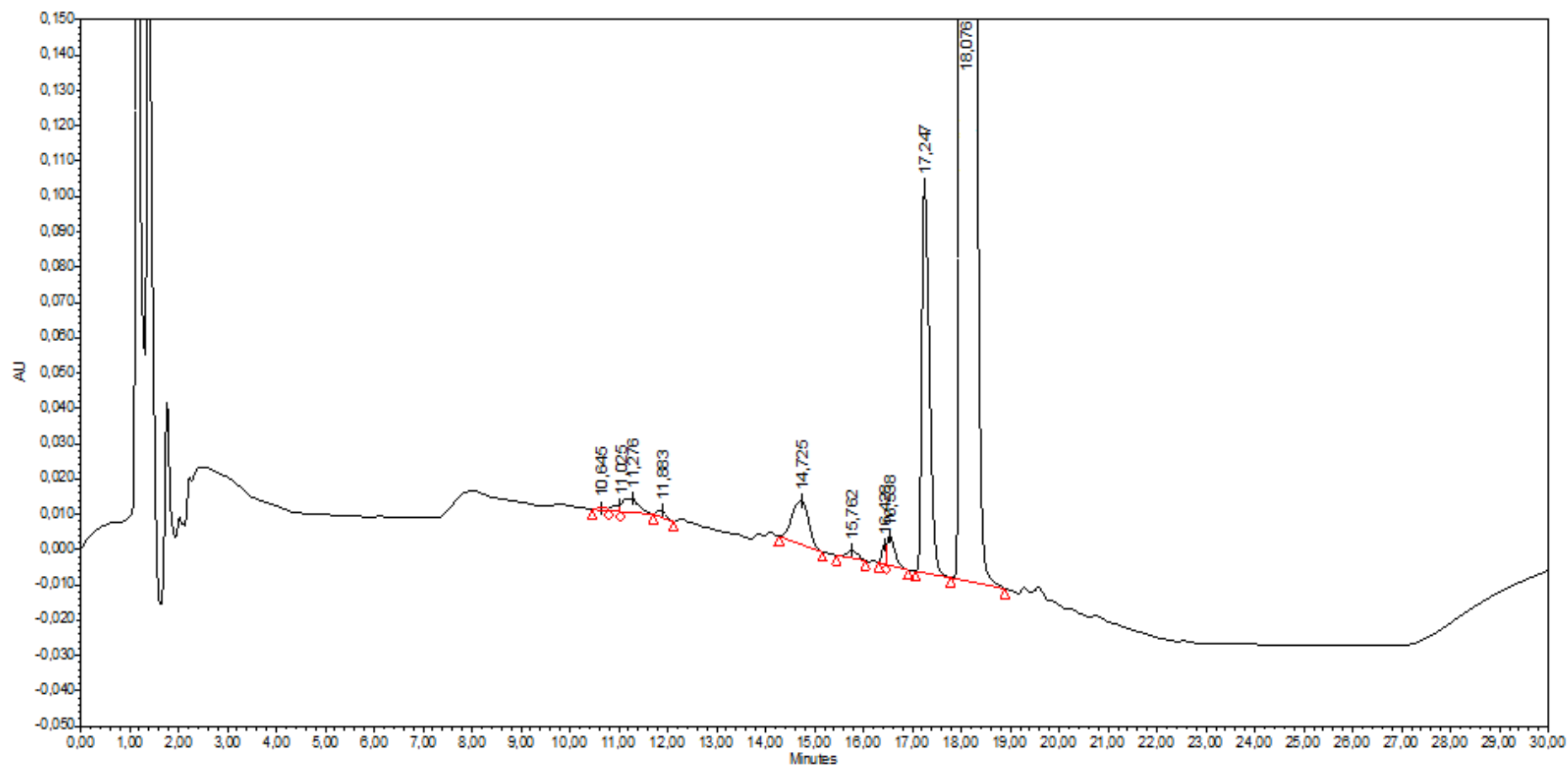
Tabuľka 3.12 Priebeh gradientu mobilnej fázy pre stanovenie čistoty modifikovanou metódou

Čas (min)	mf A	mf B
0-5	10	90
5-20	10 \rightarrow 90	90 \rightarrow 10
20-25	90	10
25-30	90 \rightarrow 10	10 \rightarrow 90

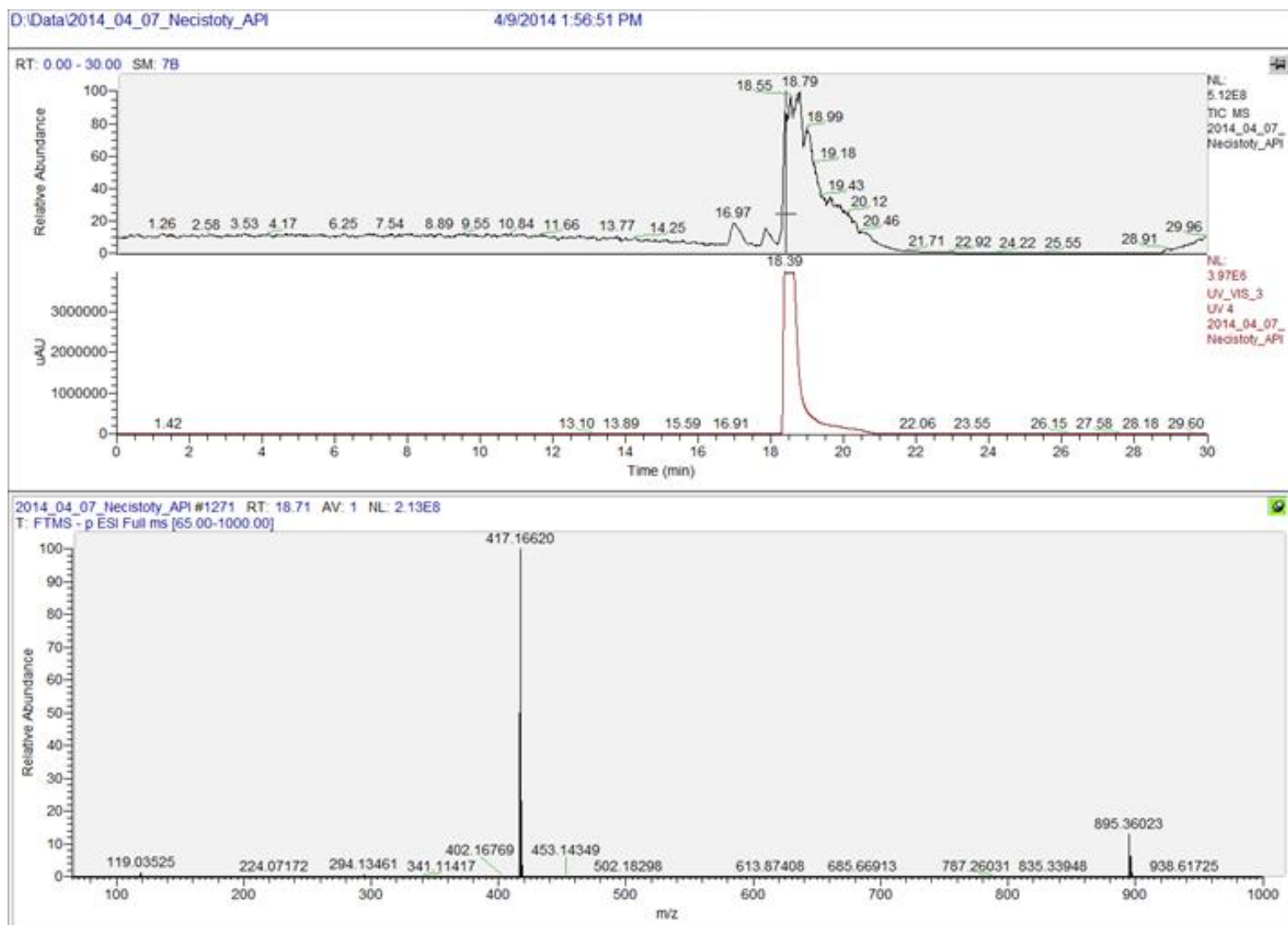
Vzorové chromatografické záznamy uvádza Obrázok 3.44 a Obrázok 3.45. Záznamy z LC-HRMS zobrazujú Obrázok 3.46 až Obrázok 3.48. Pri porovnaní retenčných časov pík na chromatografických záznamoch z HPLC a záznamoch LC-HRMS je vidieť mierny posun, ktorý je spôsobený inou kolónou a aj iným chromatografickým systémom.



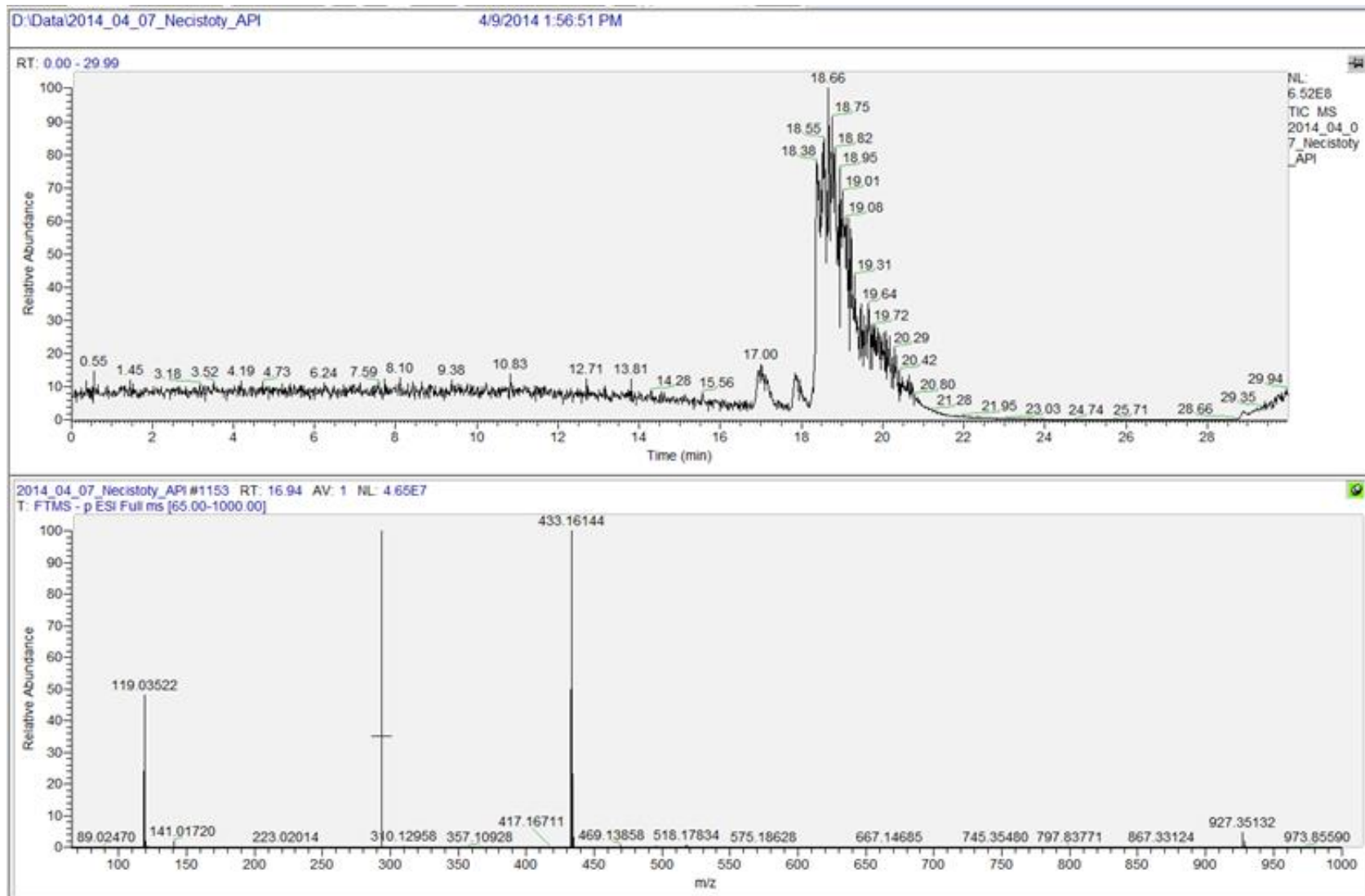
Obrázok 3.44 Chromatografický záznam stanovenia čistoty finálnej liekovej formy analyzovaný modifikovanou metódou šarža č. 3



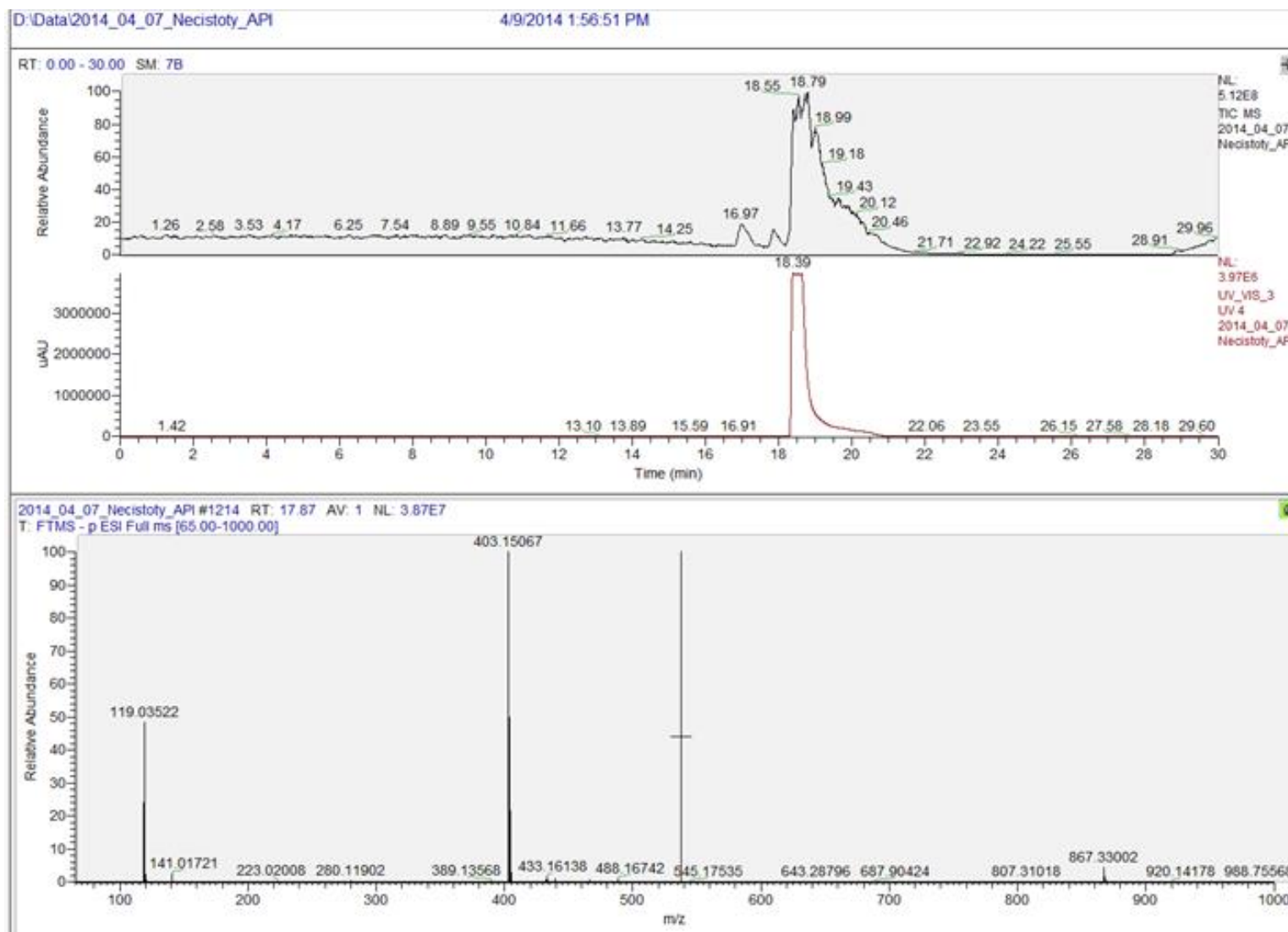
Obrázok 3.45 Chromatografický záznam stanovenia čistoty finálnej liekovej formy analyzovaný modifikovanou metódou šarža č. 1



Obrázok 3.46 LC-HRMS záznam API „Y“ (RT=18,79; $[M-H]^-$ vypočítané 417,174 m/z, stanovené 417,16620 m/z)



Obrázok 3.47 LC-HRMS záznam nečistoty RRT = 0,26 ($[M-H]^-$ vypočítané 433,1689 m/z, stanovené 433,16141 m/z)



Obrázok 3.48 LC-HRMS záznam nečistoty RRT = 0,41 ($[M-H]^-$ vypočítané 403,1584 m/z, stanovené 403,1584 m/z)

Z vyššie uvedených chromatografických záznamov Obrázok 3.47 a Obrázok 3.48 je možné určiť štruktúru nečistôt. Neznáma nečistota so stanovenou hodnotou hmoty $[M-H]^-$ 433,16141 m/z (podľa pôvodnej HPLC metódy s RT = 3,9 min (RRT = 0,26), podľa novej metódy RT = 16,5 min, resp. 16,95 min) je oxidovaná forma API „Y“.

Neznáma nečistota so stanovenou hodnotou hmoty $[M-H]^-$ 403,15131 m/z (podľa pôvodnej metódy RT = 6,5 min (RRT = 0,41), podľa novej metódy RT = 17,3 min, resp. 17,8 min) je demetylovaná forma API „Y“. Miesto demetylácie bolo potvrdené aj na základe rešerše metabolizmu API „Y“ cytochrómom P₄₅₀ — látka môže byť teda považovaná za potenciálny metabolit.^{136,*}

Napriek tomu, že sa nepodarilo určiť príčinu generovaných nečistôt, na základe prevedenej identifikácie nečistôt je možné konštatovať, že API „Y“ bola počas výroby finálnej liekovej formy vystavená pôsobeniu oxidačných činidiel s pravdepodobným radikálovým mechanizmom účinku.

* Nečistoty boli izolované a ich štruktúra bola potvrdená aj nukleárnou magnetickou rezonanciou

3.2.4 Prípadová štúdia 4 — Vplyv API na finálny produkt

Táto prípadová štúdia pojednáva o stanovení kritických parametrov API „Z“, zakúpeného od nového dodávateľa, tak aby aj finálna lieková forma vyhovovala platnej špecifikácii.

Aj keď novo dodávaná API „Z“ zodpovedala požiadavkám aktuálnej špecifikácie, po zmene dodávateľa API bolo zistené, že finálna lieková forma v niektorých skúškach spĺňa s problémami požadovanú špecifikáciu. Preto cieľom tohto skúmania bolo zistiť kritické parametre/fyzikálno-chemické vlastnosti API, ktoré ovplyvňujú kvalitu perorálnej dávkovej formy. Následne tieto nové kritické kvalitatívne znaky môžu byť doporučené ako nové parametre pre zmenu aktuálnej špecifikácie API, aby nemuselo byť menené zloženie tablety a následne vykonávané zmeny v registrácii.

Všetky vzorky API „Z“ (AS-1 — AS-5), t. j. päť rôznych šarží, boli dodané od externých dodávateľov; vzorky AS-1, AS-2, AS-4 a AS-5 od nového dodávateľa a vzorka AS-3 je od predchádzajúceho dodávateľa a bola zahrnutá do hodnotenia ako štandardná porovnávací šarža. Finálne liekové formy — vzorky tabliet TS-1 — TS-5 boli vyrobené rovnakým validovaným a registrovaným výrobným postupom.

Popri rutinnej QC kontrole disolúcie finálnych tabliet bolo zistené, že šarža TS-1 nespĺňa kritéria disolučných testov podľa metódy predpísanej v platnej špecifikácii liekového produktu a šarža TS-2 poskytuje hraničné výsledky. Bol prekontrolovaný technologický postup výroby, a pretože neboli nájdené žiadne odchýlky, bola vyslovená hypotéza, že dôvodom sú parametre API „Z“ z dvoch šarží dodávok AS-1 a AS-2 od nového dodávateľa, z ktorých boli vyrobené problematické šarže tabliet TS-1 a TS-2. Výsledky týchto analýz boli overené porovnaním s výsledkami disolúcie tabliet vzorky TS-3, ktorá bola vyrobená rovnakým validovaným postupom ako vzorky TS-1 a TS-2 z API AS-3 zakúpenej od predchádzajúceho dodávateľa. Vzorka tabliet TS-3 splnila všetky kritériá platnej špecifikácie finálnej liekovej formy. Na základe týchto pozorovaní bolo vykonané analytické/fyzikálno-chemické hodnotenie a boli analyzované finálne formulácie a takisto substancie AS-1, AS-2 a AS-3, ktoré boli tiež testované ich disolučné profily/disolúcia a boli zistené značné rozdiely, pozri Obrázok 3.49.

Boli prevedené rozsiahle hodnotenia parametrov API, aby sa definovali tie parametre API, ktoré sú potrebné pre splnenie kritérií platnej špecifikácie finálneho prípravku. Všetky výsledky z disolúcií uvádza Tabuľka 3.14, sumarizuje výsledky stanovenia obsahu vody, hodnoty zeta poteciálu, špecifického povrchu a veľkosti častíc. Fotky z elektrónového mikroskopu uvádza Obrázok 3.53.

Vyšetrovanie vzoriek AS-1 — AS-3 sa začalo stanovením polymorfizmu práškovou röntgenovou difrakciou (PXRD). Možno konštatovať, že všetky hodnotené vzorky API „Z“ obsahovali rovnaký polymorf (otázka polymorfie týchto API je diskutovaná ďalej). Aj keď vzorky od nového dodávateľa AS-1 a AS-2 splnili kritériá špecifikácie pre API, bolo zistené, že zmena kvality nových vzoriek API „Z“ má vplyv na výrobu finálnej liekovej formy; nové vzorky vykázali značnú príľnavosť a elektrostatický náboj v porovnaní s API „Z“ od predchádzajúceho dodávateľa. S ohľadom na nižšie diskutované výsledky možno predpokladať, že tieto vlastnosti sú spojené s distribúciou veľkosti častíc. Ďalej boli testované ďalšie parametre, ako je zeta potenciál, veľkosť častíc, špecifická povrchová plocha, obsah vody a kontaktný uhol vody zo všetkých troch šarží API „Z“ (AS-1, AS-2 a AS-3).

Na základe získaných predbežných výsledkov boli výrobcovi zaslané požiadavky pre úpravu parametrov API. Následne dodané dve nové šarže API „Z“ (AS-4a AS-5), od nového dodávateľa, vyrobené podľa týchto odporúčaní, poskytli šarže tabliet TS-4 a TS-5, ktoré boli hodnotené na všetky vyššie uvedené skúšky a uvedené parametre boli overené. Na základe výsledkov bol finalizovaný návrh kritických parametrov. Aj keď celkový počet vzoriek bol obmedzený, boli nájdené niektoré vzťahy medzi vlastnosťami/parametrami API „Z“ a ich disolúciou.

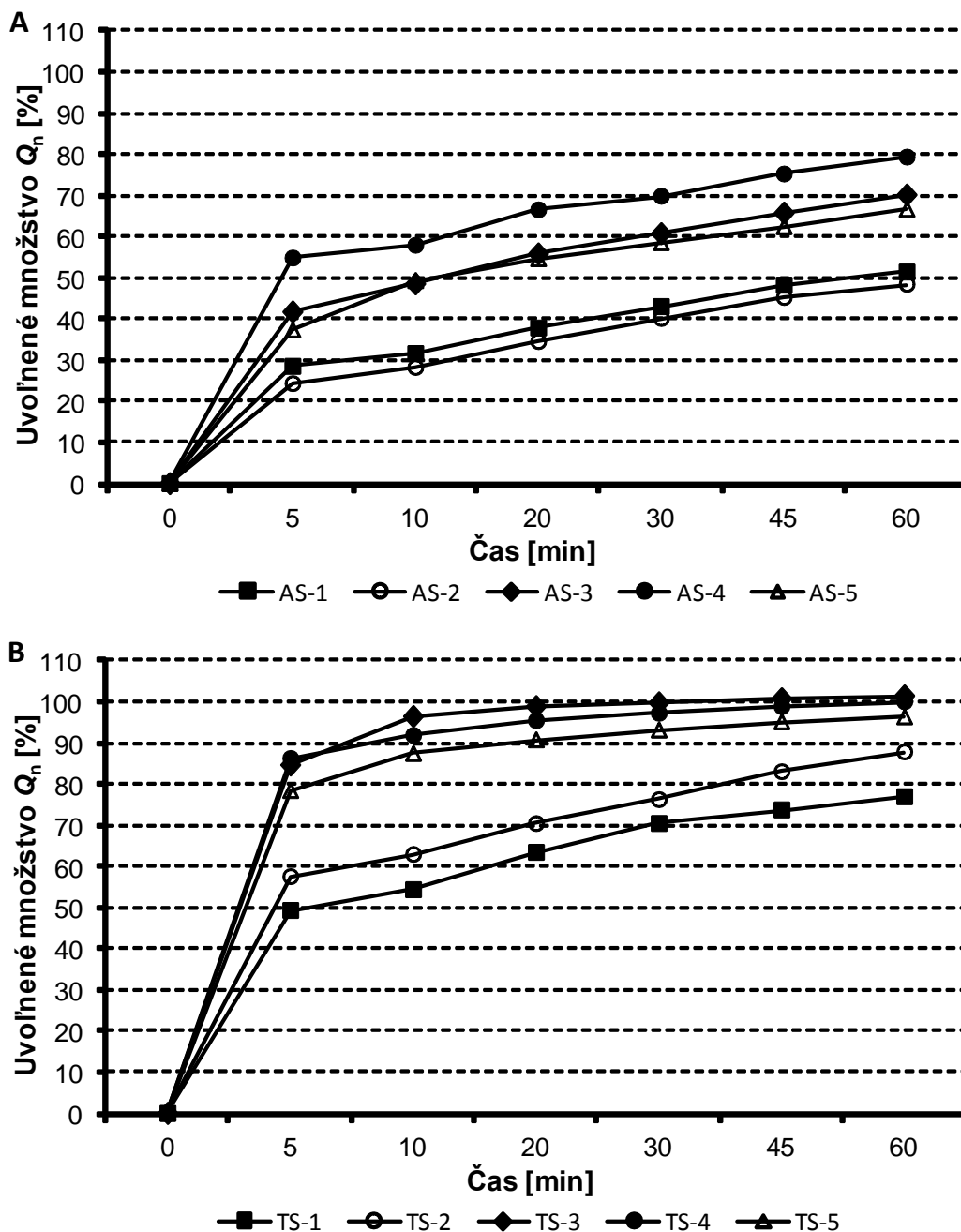
Porovnanie disolučných profilov (disolúcia vyjadrená Q_n [%]) jednotlivých vzoriek uvádza

Tabuľka 3.13 a znázorňuje Obrázok 3.49. Disolúcia šarží API „Z“ (AS-1 — AS-5) a tabliet (TS-1 — TS-5) bola vykonaná podľa platnej špecifikácie vo fosfátovom pufri (pH = 7,2). Rovnaké disolučné médium a koncentrácia boli použité pre stanovenie zeta potenciálu a zmáčavosť — kontaktný uhol vody, vid' nižšie. Všetky experimenty boli opakované, dáta bola vyjadrené ako priemer \pm SD a výsledky boli porovnané pomocou štatistickej analýzy. Rozdiely boli hodnotené pomocou jednofaktorovej analýzy rozptylu (ANOVA) doplnené o výsledky Bonferroniho viacnásobného porovnávacieho testu. Rozdiely boli považované za významné pri $P = 0,05$.

Tabuľka 3.13 Uvoľnené množstvo Q_n [%] samotnej API „Z“ a API z tabliet. Hodnoty Q_n sú vyjadrené ako priemer \pm SD (n = 6 stanovení). Hodnoty označené rôznymi písmenami, sa výrazne líšia v $P = 0,05$.

Vzorka	Uvoľnené množstvo Q_n [%]					
	5 min	10 min	20 min	30 min	45 min	60 min
AS-1	28,5 \pm 3,2 ^a	31,6 \pm 4,0 ^a	37,8 \pm 4,0 ^a	43,0 \pm 4,3 ^a	48,2 \pm 3,9 ^a	51,4 \pm 4,0 ^a
AS-2	24,3 \pm 3,9 ^a	28,2 \pm 4,0 ^a	34,5 \pm 4,8 ^a	40,1 \pm 5,0 ^a	45,2 \pm 6,1 ^a	48,4 \pm 5,7 ^a
AS-3	41,7 \pm 0,3 ^c	48,5 \pm 0,4 ^b	55,8 \pm 0,5 ^b	60,7 \pm 0,5 ^b	65,7 \pm 0,3 ^c	70,1 \pm 0,4 ^c
AS-4	54,8 \pm 0,4 ^e	57,9 \pm 2,5 ^c	66,5 \pm 2,7 ^{cd}	69,8 \pm 1,5 ^c	75,2 \pm 0,9 ^d	79,3 \pm 1,3 ^d
AS-5	37,3 \pm 0,3 ^b	49,3 \pm 0,5 ^b	54,6 \pm 2,3 ^b	58,5 \pm 1,6 ^b	62,4 \pm 1,1 ^b	66,6 \pm 1,1 ^b
TS-1	49,3 \pm 3,2 ^d	54,3 \pm 2,1 ^c	63,4 \pm 2,2 ^c	70,4 \pm 2,3 ^c	73,7 \pm 2,7 ^d	76,9 \pm 2,0 ^d
TS-2	57,5 \pm 1,2 ^f	62,9 \pm 1,1 ^d	70,4 \pm 1,2 ^{cd}	76,2 \pm 1,4 ^d	83,0 \pm 1,5 ^e	87,8 \pm 1,9 ^e
TS-3	84,6 \pm 1,9 ^h	96,4 \pm 2,1 ^e	98,8 \pm 2,2 ^g	99,7 \pm 2,1 ^f	100,7 \pm 2,4 ^g	101,4 \pm 2,1 ^g
TS-4	86,2 \pm 1,2 ^h	91,8 \pm 0,9 ^f	95,4 \pm 0,8 ^f	97,2 \pm 0,8 ^f	98,8 \pm 0,9 ^g	100,0 \pm 0,8 ^g
TS-5	78,4 \pm 1,7 ^g	87,4 \pm 2,4 ^e	90,7 \pm 2,1 ^e	93,1 \pm 1,8 ^e	95,1 \pm 1,8 ^f	96,3 \pm 1,6 ^f

Je zrejmé, že hodnoty Q_n samotnej API sú podstatne nižšie (viď Obrázok 3.49 A) ako hodnoty Q_n API z tabliet (viď Obrázok 3.49 B). Táto skutočnosť môže byť spôsobená tým, že pomocná látka (stearan vápenatý) uľahčuje solubilizáciu API „Z“. Počas disolúcie bolo pozorované odlišné správanie API „Z“ AS-1 a AS-2 v porovnaní s AS-3, AS-4 a AS-5. Obe API „Z“ AS-1 a AS-2 zostali na povrchu ako nezmáčané, zatiaľ čo ostatné klesli z hladiny a rozpustili sa. Z údajov, ktoré uvádza Obrázok 3.49 A a B možno predpokladať, že keď rozpustené množstvo API „Z“ v 10. minúte (Q_{10}) sa rovná približne 50 %, disolúcia tabliet bude v súlade s platnou špecifikáciou ($Q = 75\%$ deklarovaného množstva v 45 min).



Obrázok 3.49 Disolučné profily (uvolnené množstvo Q_n [%]) jednotlivých vzoriek API „Z“ AS-1 — AS-5 (A) a individuálnych tabliet TS-1 — TS-5 (B). Hodnoty Q_n sú vyjadrené ako priemer \pm SD ($n = 6$ meraní). SD nie sú znázornené na zlepšenie vizualizácie.

Štatistickou analýzou, vid' Tabuľka 3.13, boli potvrdené významné rozdiely ($P = 0,05$) medzi hodnotami Q_n určených pre vzorky AS-1/TS-1, AS-2/TS-2 a vyhovujúcich vzoriek AS-3/TS-3 — AS-5/TS-5. Zo strmosti kriviek grafu Obrázok 3.49 A a B, teda z rozpúšťania, je zrejmé, že najrýchlejšie sa rozpúšťa API „Z“ samotná alebo formulovaná ak sa jej najväčšie množstvo rozpustí do 5 min. Ďalších 5 min sa rýchlosť rozpúšťania spomalí, ale v porovnaní s ďalším časovým intervalom (od 10. do 60. minúty) môže

byť konštatované, že predovšetkým pri finálnej liekovej forme, je pre vyhovujúci výsledok disolúcie najdôležitejšie množstvo rozpustenej látky práve do 10. minúty. Z tohto dôvodu všetky dolu uvedené grafy, vid' Obrázok 3.50 až Obrázok 3.52 a Obrázok 3.54 zobrazujú množstvo rozpustenej API „Z“ v 10. minúte (Q_{10}). Je dôležité si uvedomiť, že závislosti zobrazené a popisované nižšie sú samozrejme platné aj pre rozpustené množstvo Q_n v ostatných meraných časových intervaloch.

Ako bolo uvedené vyššie, vzorky API „Z“ AS-1 — AS-5 boli vyhodnocované na obsah vody, zmáčavosť, zeta potenciál, veľkosti častíc a špecifický povrch. Tiež tvary jednotlivých vzoriek API „Z“ boli skúmané skenovacím elektrónovým mikroskopom. Všetky tieto výsledky uvádza Tabuľka 3.14 a znázorňuje Obrázok 3.53.

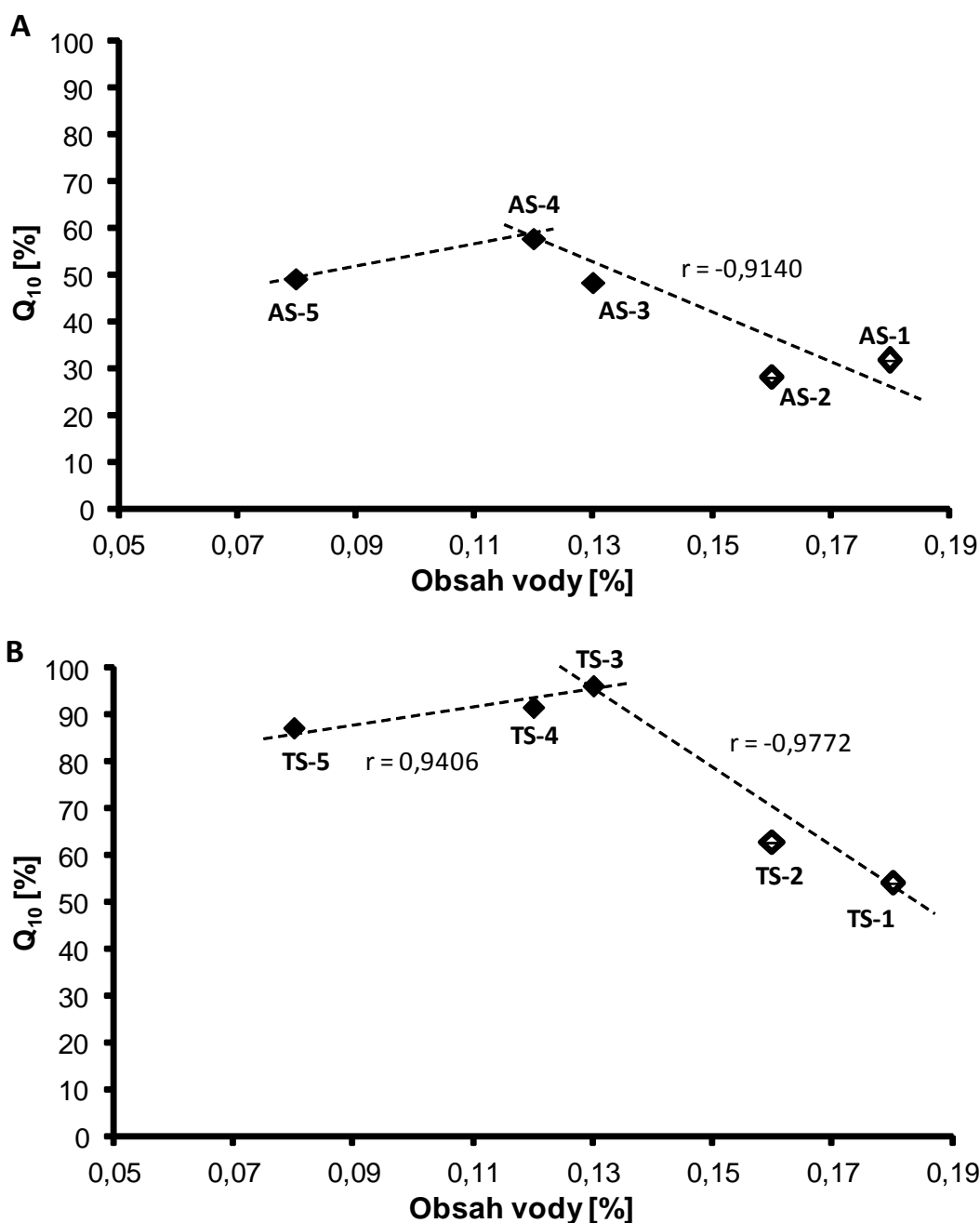
Tabuľka 3.14 Ďalšie parametre skúmaných vzoriek API „Z“ AS-1 — AS-5: obsah vody [%], zmáčateľnosť (styku s vodou pod uhlom θ Vstup [°]), zeta potenciál (ζ [mV]), veľkosť častíc (x_{10} , x_{50} , x_{90} [μm]), a špecifický povrch (SSA [m^2/g]). Hodnoty sú vyjadrené ako priemer \pm SD. Hodnoty označené rôznymi písmenami, sa výrazne líšia v $P = 0,05$.

Vzorka	Voda [%]	θ [°]	ζ [mV]	Veľkosť častíc [μm]			SSA [m^2/g]
				x_{10}	x_{50}	x_{90}	
AS-1	0,18 \pm 0,01 _c	35,6 \pm 1,7 _b	- 18,13 \pm 1,94 ^a	0,51 \pm 0,01 ^a	2,12 \pm 0,01 ^a	8,57 \pm 0,37 ^a	42,11 \pm 0,03 ^d
AS-2	0,16 \pm 0,01 _c	34,9 \pm 3,1 _b	- 17,98 \pm 0,34 ^a	0,49 \pm 0,01 ^a	2,18 \pm 0,12 ^b	9,06 \pm 0,39 ^b	59,65 \pm 0,04 ^e
AS-3	0,13 \pm 0,01 _b	11,0 \pm 6,6 _a	- 10,36 \pm 0,40 ^b	0,74 \pm 0,01 ^b	3,15 \pm 0,08 ^d	13,36 \pm 0,19 ^d	31,91 \pm 0,04 ^c
AS-4	0,12 \pm 0,01 _b	35,2 \pm 0,7 _b	-2,64 \pm 0,17 ^c	0,73 \pm 0,06 ^b	2,36 \pm 0,04 ^c	10,33 \pm 0,14 ^c	23,21 \pm 0,05 ^b
AS-5	0,08 \pm 0,01 _a	33,4 \pm 2,7 _b	- 10,90 \pm 0,37 ^b	1,02 \pm 0,03 ^c	5,05 \pm 0,05 ^e	15,97 \pm 0,24 ^e	19,69 \pm 0,06 ^a

Štatistickou analýzou, vid' Tabuľka 3.14, boli znovu nájdené podstatné rozdiely na hladine významnosti $P = 0,05$ medzi obsahom vody, zeta potenciálom, veľkosťou častíc a špecifickým povrchom pre nevyhovujúce vzorky AS-1/TS-1, AS-2/TS-2, a vzorkami AS-3/TS-3 — AS-5/TS-5, ktoré boli vyhovujúce. Nebola zistená štatistická významnosť pre vzorky AS-1, AS-2, AS-4 a AS-5 vzhľadom na veľkosť kontaktného uhla (zmáčavosť).

Bilineárne závislosti hodnôt Q_{10} na obsah vody v API uvádza Obrázok 3.50. Je zrejmé, že hodnoty Q_{10} týchto API-1, AS-2, ktoré sú vo formuláciách TS-1, TS-2, ktoré sú nevyhovujúce/hraničné, sú nízke a predstavujú vzdialené body. Klesajúca závislosť, vid' Obrázok 3.50 A, má korelačný koeficient $r = -0,9140$ ($n = 4$), rastúca závislosť,

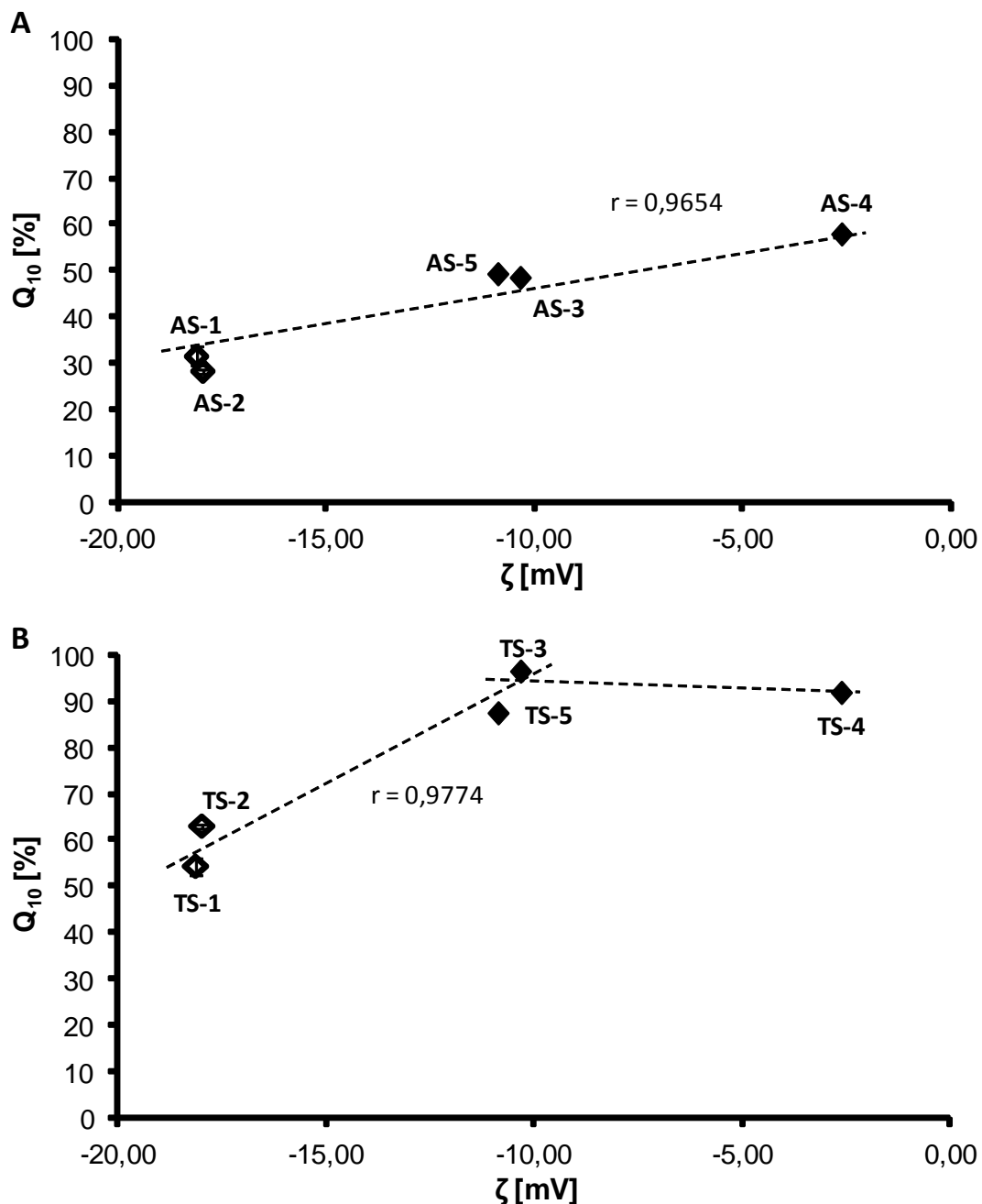
vid' Obrázok 3.50 B, má korelačný koeficient $r = 0,9406$ ($n = 3$), a klesajúca závislosť, vid' Obrázok 3.50 B, má korelačný koeficient $r = -0,9772$ ($n = 3$). Ako optimum sa javí 0,12 — 0,13% obsah vody. Možno konštatovať, že vzorky s obsahom vody presahujúcim 0,13% môžu nespĺňať špecifikačné limity testu disolúcie. Jednoznačne to potvrdzuje fakt, že API „Z“ s obsahom vody vyšším ako 0,16% limitu nevyhovuje.



Obrázok 3.50 Závislosť uvoľneného množstva Q [%] jednotlivých vzoriek API AS-1 — AS-5 (A) a individuálnych tabliet TS-1 — TS-5 (B) v 10. minúte na obsahu vody [%]. Vzorky s hraničnými hodnotami AS-1, AS-2, TS-1, TS-2 sú označené prázdny symbolmi. Údaje predstavujú priemer \pm SD z troch vzoriek.

Zmäčateľnosť vyjadrená hodnotou kontaktného uhla (θ [°]) neposkytla požadované informácie. Z výsledkov, ktoré uvádza Tabuľka 3.14 je zrejme, že všetky vzorky API „Z“ sú zmáčateľné ($\theta < 90^\circ$ sa vzťahuje na zlúčeniny s dobrou zmáčateľnosťou).¹³⁷ Všetky uhly boli do 35° ; avšak je možné konštatovať, že AS-3 je substancia s vynikajúcou zmáčateľnosťou, ktorá spôsobuje, že API „Z“ absorbuje vodu príliš rýchlo.

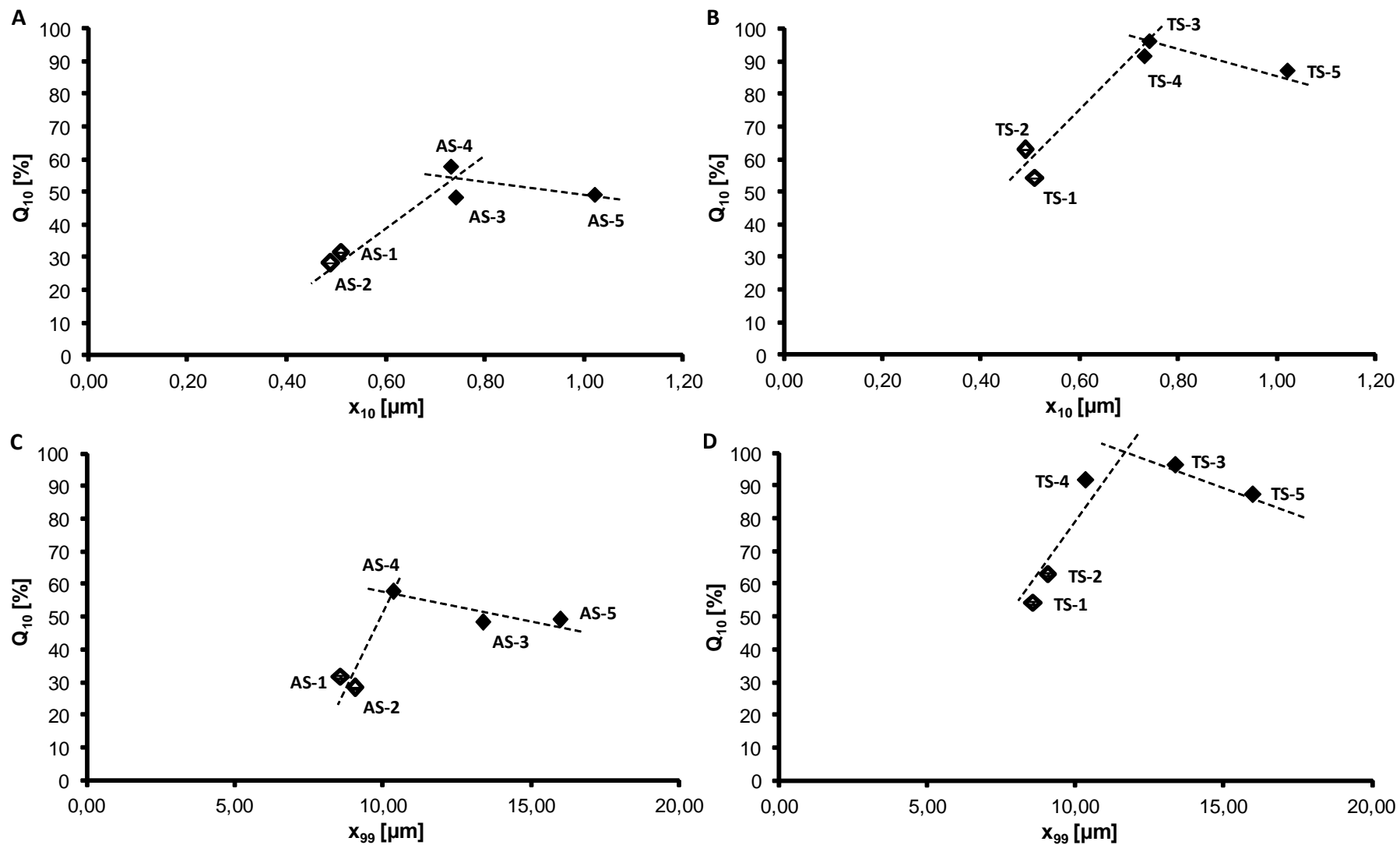
Všeobecne platí, že zeta potenciál sa používa na určenie stability koloidných systémov. Vysoký zeta potenciál ($\zeta > \pm 30$ mV) indikuje stabilitu systému (odolnosť voči vytváraniu zhlukov). Ak je potenciál malý (v intervale od 0 do ± 30 mV), príťažlivé sily môžu prekonať odpor, a systém má tendenciu zrážať sa.¹³⁸ Pri meraní zeta potenciálu bol zvolený fosfátový pufor s $\text{pH} = 7,2$ a koncentrácia API „Z“ tak, aby sa odrážali skutočné podmienky disolúcie. Hodnoty zeta potenciálu hraničných vzoriek AS-1, AS-2 ($\zeta \approx -18$ mV) sa výrazne líšia od hodnôt vyhovujúcich vzoriek AS-3, AS-4 a AS-5 ($\zeta \approx -3$ mV, $\zeta \approx -11$ mV), vid' Tabuľka 3.14, a je možné konštatovať, že vzorky so zeta potenciálom v blízkosti nuly vykazujú podstatne vyššiu rozpustnosť. Závislosti hodnôt Q_{10} vzoriek na zeta potenciále uvádza Obrázok 3.51. Závislosť disolúcie API na zeta potenciále je lineárne stúpajúca (korelačný koeficient $r = 0,9654$, $n = 5$), so zeta potenciálom v blízkosti 0 mV (vid' Obrázok 3.51 A), zatiaľ čo pre disolúciu API z tabliet bol zistený dvojfázový priebeh (Obrázok 3.51 B). Až do optimálnej hodnoty $\zeta \approx -11$ mV, bol pozorovaný lineárny nárast Q_{10} ($r = 0,9774$, $n = 4$), a ďalšie zvýšenie zeta potenciálu významne neovplyvnilo uvoľnené množstvo. Odlišné priebehy závislostí, ktoré znázorňuje Obrázok 3.51 A a B možno vysvetliť vplyvom pôsobenia pomocných látok na API „Z“. Na základe týchto údajov je možné urobiť záver, že čím viac sú hodnoty zeta potenciálu vzdialené od nuly, tým menej sú látky rozpustné. Aj napriek obmedzenému počtu vzoriek pre hodnotenie, zeta potenciál v rozmedzí od 0 do -11 mV možno považovať za vyhovujúci pre dobrú rozpustnosť.



Obrázok 3.51 Závislosť uvoľneného množstva Q [%] jednotlivých vzoriek API „Z“ AS-1 — AS-5 (A) a jednotlivých tabliet TS-1 — TS-5 (b) v 10. minúte od hodnôt zeta potenciálu (ζ [mV]). Vzorky s hraničnými hodnotami AS-1, AS-2, TS-1, TS-2 sú označené prázdnyimi symbolmi. Údaje predstavujú priemer \pm SD zo štyroch vzoriek.

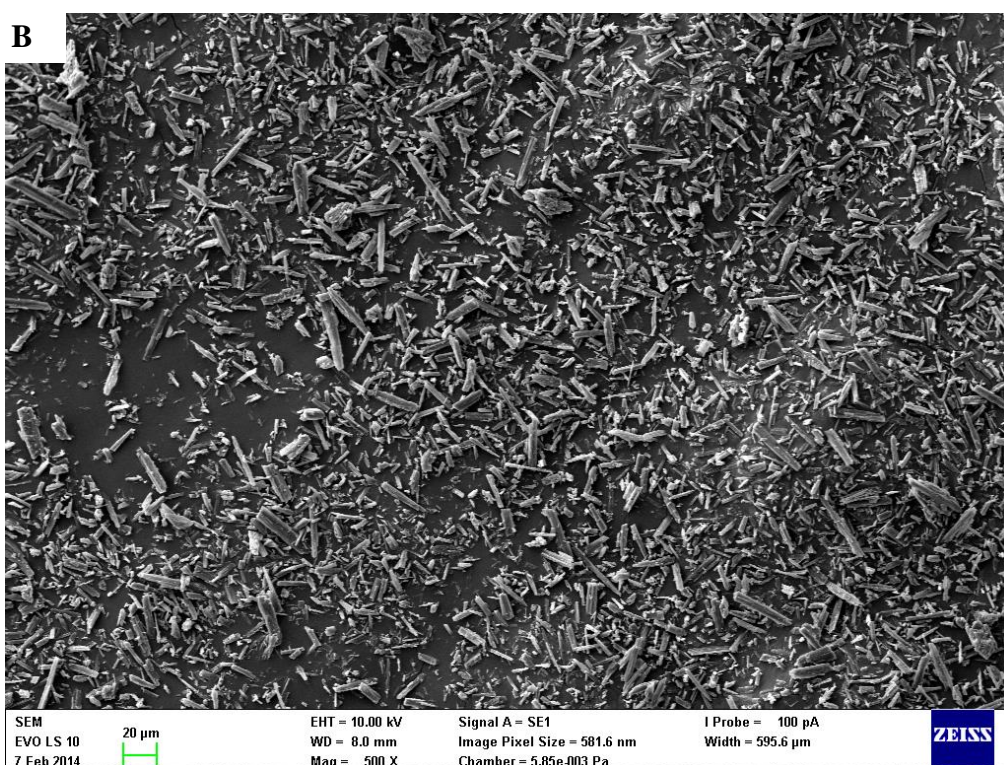
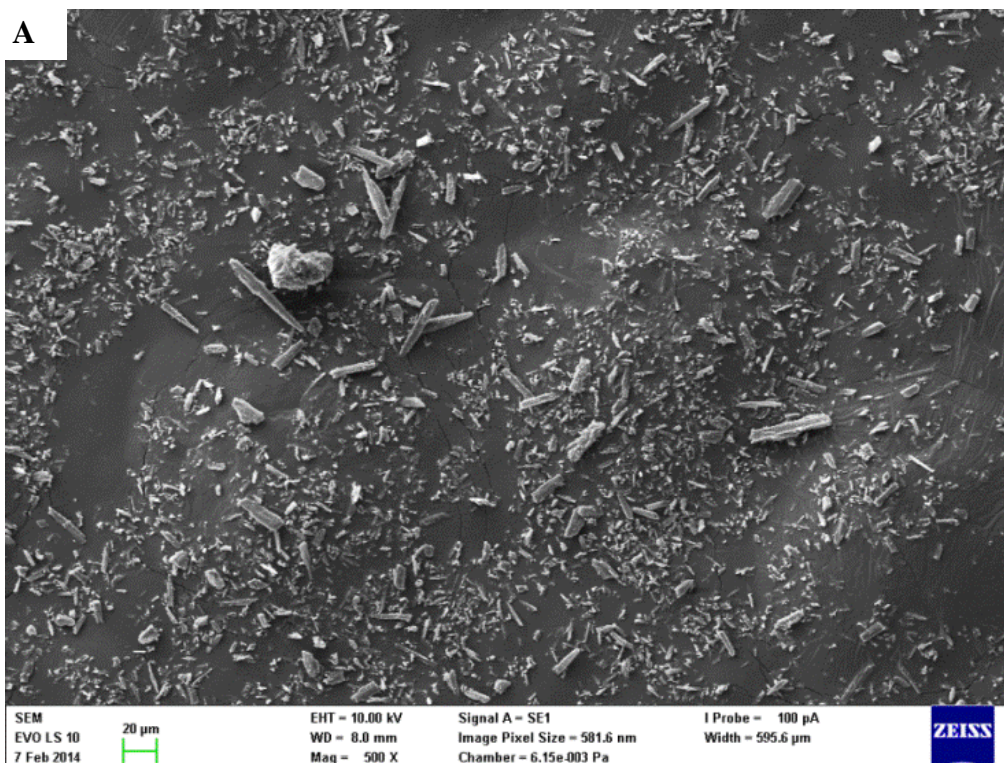
Obrázok 3.52 znázorňuje závislosť hodnoty Q_{10} v jednotlivých vzorkách API „Z“ (Obrázok 3.52 A a C) alebo uvoľnené množstvo API „Z“ z jednotlivých tabliet (Obrázok 3.52 B a D) od veľkosti častíc. Okrajové veľkosti častíc x_{10} a x_{99} boli vybrané pre zvýraznenie týchto závislostí. Bilineárne krivky možno pozorovať pre závislosť uvoľňovania od veľkosti častíc s optimálnou veľkosťou častíc $x_{10} \approx 0,74 \mu\text{m}$ a $x_{99} \approx 10 - 13 \mu\text{m}$. Najmä na Obrázok 3.52 B a D, ktoré zobrazujú uvoľňovanie API „Z“ z tabliet je možné vidieť, že distribučný

profil veľkosti častíc látky spôsobuje menej významný vplyv na množstvo uvoľnenej látky, než zníženie veľkosti častíc (porovnaj vzorky 1, 2 a 5). Aj keď zníženie veľkosti častíc pomáha formulácii finálnej liekovej formy vo vode málo rozpustných API,¹³⁹ v tomto prípade veľký podiel malých častíc vedie k významnému zníženiu uvoľňovania a pravdepodobne tiež vedie k ťažkostiam, spracovateľnosti. Výrazný pokles uvoľneného množstva API „Z“ s veľkým podielom malých častíc môže tiež súvisieť s povrchovou plochou častíc, vid' nižšie. Na základe výsledkov, ktoré uvádza Tabuľka 3.14 a znázorňuje Obrázok 3.52, je možné konštatovať, že limity veľkosti častíc by mali byť 0,8 — 1,0 μm pre x_{10} , 2,4 — 5,1 μm pre x_{50} a 11 — 16 μm pre x_{99} .

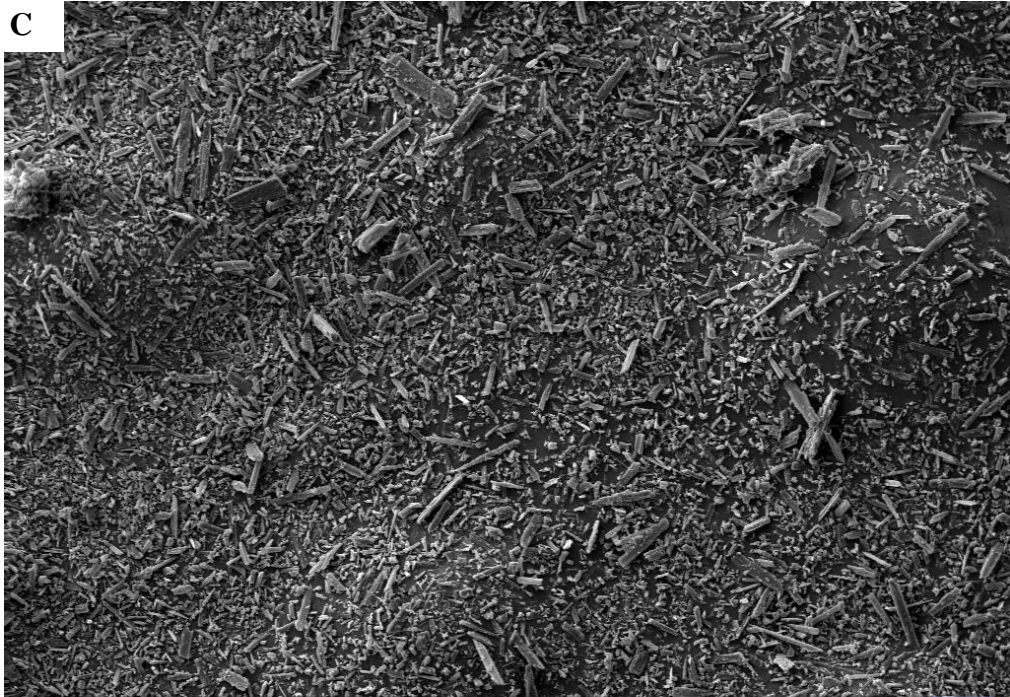



Obrázok 3.52 Závislosť uvoľneného množstva Q [%] jednotlivých vzoriek API AS-1 — AS-5 (A, C) a jednotlivých tabliet TS-1 — TS-5 (B, D) v 10. minúte od veľkosti častíc (x_{10} a x_{99} [μm]). Vzorky s hraničnými hodnotami AS-1, AS-2, TS-1, TS-2 sú označené prázdny symbolmi. Údaje predstavujú priemer \pm SD z piatich vzoriek.

Vyšetrovanie distribúcie veľkosti častíc úzko súvisí s analýzou tvaru častíc. SEM analýza všetkých vzoriek API „Z“ podporuje výsledky analýzy distribúcie veľkosti častíc. Fotografie z mikroskopu vzoriek AS-1 až AS-5 pri 500× zväčšení uvádza Obrázok 3.53. Tvar všetkých meraných častíc pri zovšeobecnení je možné považovať za doštičky alebo tyčinky: doštičky AS-1 a AS-2 sú veľmi jemné, AS-4 sú stredné a, AS-3 a AS-5 sú hrubé.

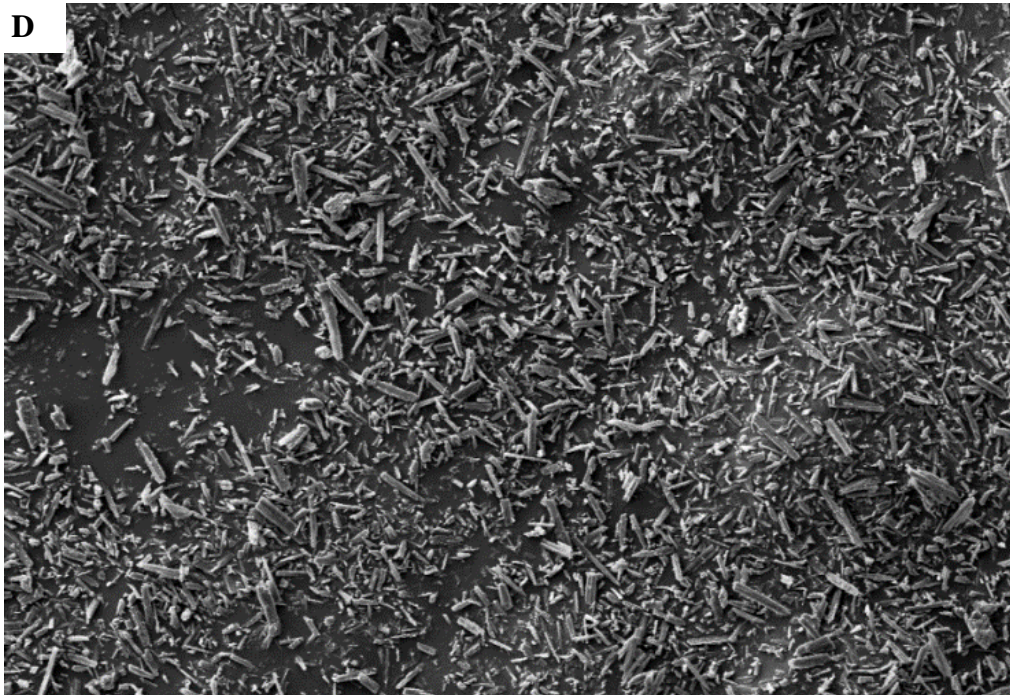



C

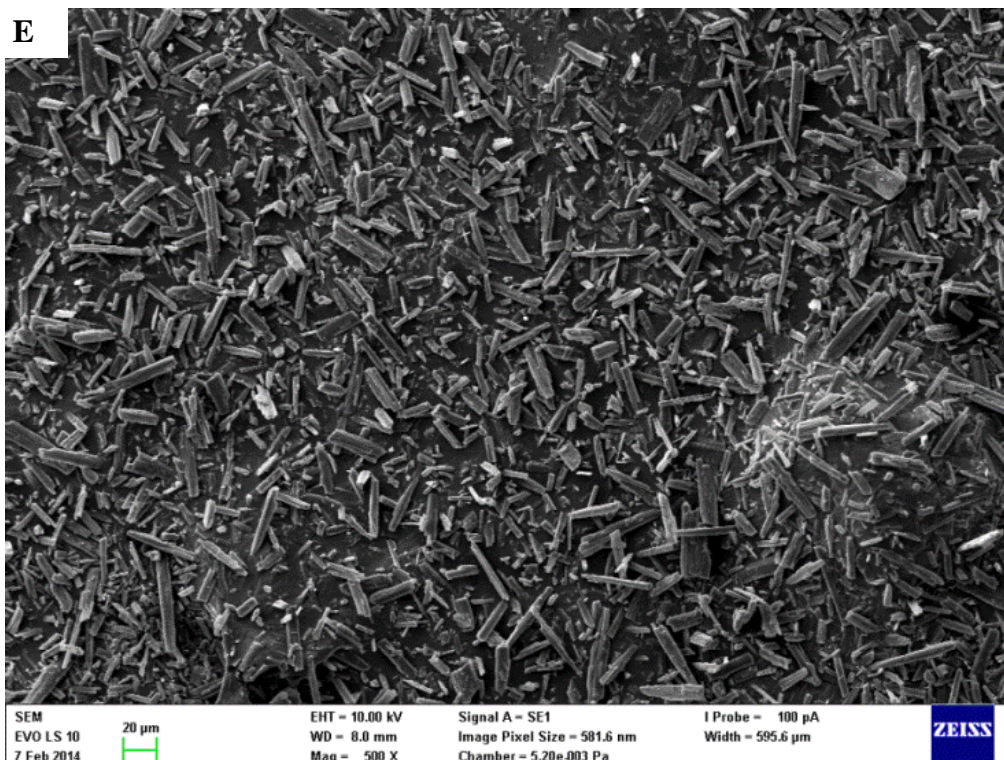


SEM	20 μ m	EHT = 10.00 kV	Signal A = SE1	I Probe = 100 pA	ZEISS
EVO LS 10		WD = 8.0 mm	Image Pixel Size = 581.6 nm	Width = 595.6 μ m	
7 Feb 2014		Mag = 500 X	Chamber = 5.50e-003 Pa		

D

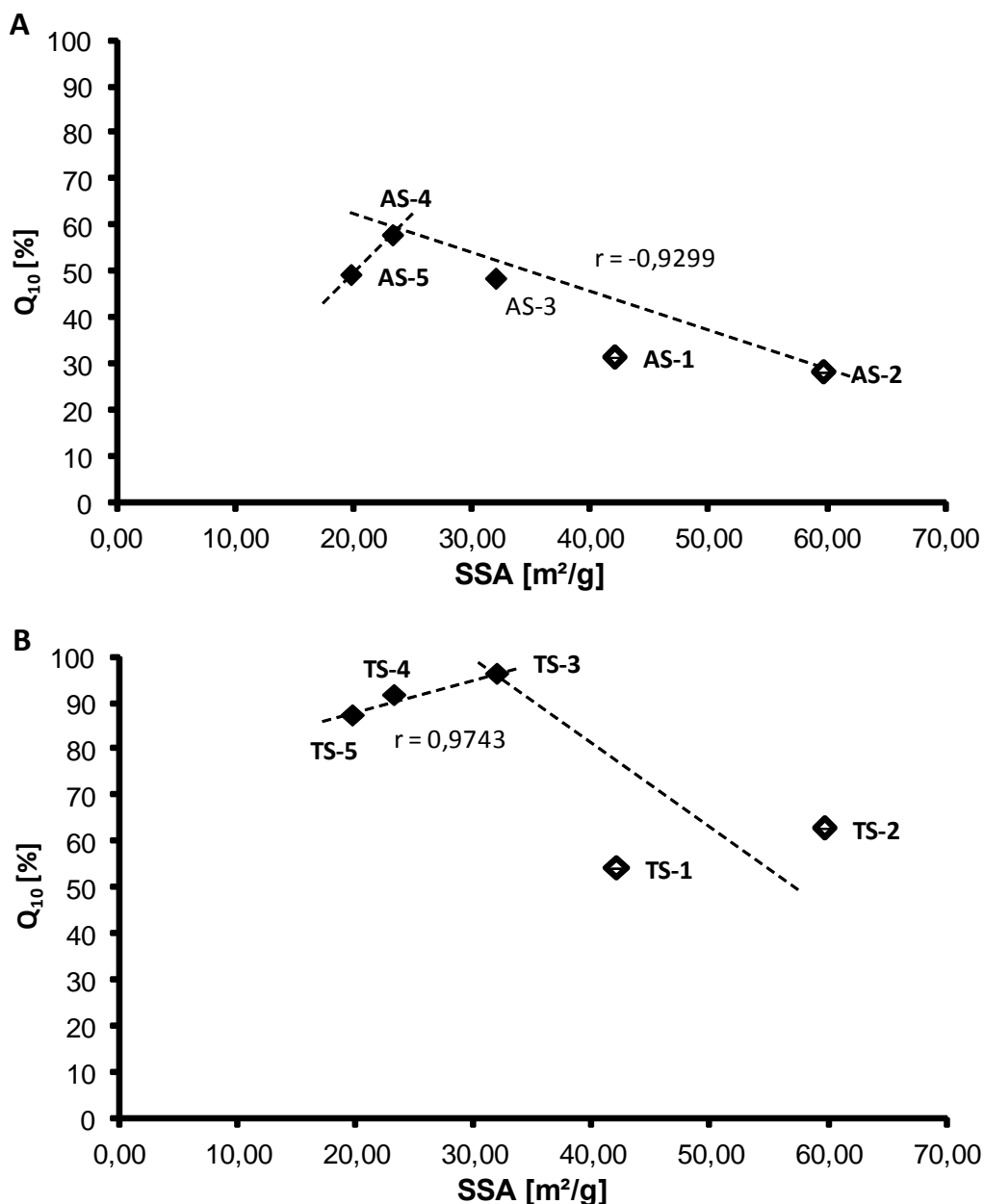


SEM	20 μ m	EHT = 10.00 kV	Signal A = SE1	I Probe = 100 pA	ZEISS
EVO LS 10		WD = 8.0 mm	Image Pixel Size = 581.6 nm	Width = 595.6 μ m	
7 Feb 2014		Mag = 500 X	Chamber = 5.85e-003 Pa		



Obrázok 3.53 SEM mikrofotografia nevyhovujúcej vzorky AS-1 (A)AS-2 (B) a vyhovujúcich vzoriek AS-4 (C) AS-3 (D) a AS-5 (E).

Špecifická plocha povrchu (SSA) často koreluje s rýchlosťou disolúcie. SSA sa zvyšuje so znižujúcou sa veľkosťou častíc, ale tiež sa zvyšuje poréznosť častíc. Poréznosť častíc, a to najmä v prípade malých pórov, môže spôsobovať SSA ďaleko väčšiu, než je zníženie veľkosti častíc. SSA ovplyvňuje spracovanie a správanie práškov a poréznych látok, pretože povrchová plocha zodpovedá vonkajšej drsnosti častice a jej vnútornej porozity.^{140,141} Jednou z možností, ako merať SSA je pomocou BET metodiky.¹³⁴ Závislosť hodnôt Q_{10} jednotlivých vzoriek API „Z“ alebo API uvoľnenej z tablety na SSA (porozite), vyjadrené ako hodnoty SSA [m^2/g] znázorňuje Obrázok 3.54. Obe hraničné API 1 a 2 (vzorky AS-1/TS-1 a AS-2/TS-2) predstavujú odľahlé body Obrázok 3.54 A a B, kde je možné znovu vidieť bilineárny priebeh; korelačný koeficient klesajúcej časti zobrazuje Obrázok 3.54 A, je $r = -0,9299$ ($n = 4$) a stúpajúcej časti zobrazuje Obrázok 3.54 B je $r = 0,9742$ ($n = 3$). Podľa výsledkov SSA $\approx 23 \text{ m}^2/\text{g}$ (AS-4), je vhodnejší pre uvoľňovanie čistej API „Z“, zatiaľ čo SSA $\approx 32 \text{ m}^2/\text{g}$ (AS-3) je vhodnejší pre uvoľňovanie z liekovej formy. Ako bolo uvedené vyššie, malá zmena v rýchlosti uvoľňovania/množstva čistej API „Z“ v porovnaní s formulovanou API je spôsobená pomocnou látkou. Zrejme v oboch prípadoch je možné zhrnúť, že pre vyhovujúce výsledky disolúcie, by špecifický povrch mal byť v rozmedzí od 20 — 32 m^2/g . Zvýšenie plochy (porézności) vedie k rýchlemu poklesu disolúcie.



Obrázok 3.54 Závislosť uvoľneného množstva Q [%] jednotlivých vzoriek API „Z“ AS-1 — AS-5 (A) a jednotlivých tabliet TS-1 — TS-5 (B) v 10. minúte na SSA [m²/g]. Vzorky s hraničnými hodnotami AS-1, AS-2, TS-1, TS-2 sú označené prázdny symbolmi. Údaje predstavujú priemer \pm SD z troch vzoriek.

Podobné výsledky možno nájsť aj pre niektoré lieky, kde zníženie veľkosti častíc vedie k zhlukovaniu látky. To spôsobuje následné zníženie účinnej plochy lieku, ktorý je vystavený pôsobeniu kvapaliny a teda zníženie rýchlosti disolúcie. K vytváraniu zhlukov pri znížení veľkosti častíc sú náchylné napr., kyselina acetylsalicylová, fenacetín alebo fenobarbital. Preto, aj keď sa všeobecne odporúča zníženie veľkosti častíc a zvýšenie povrchovej plochy pre zvýšenie rýchlosti uvoľňovania liečiv, pri niektorých API zlepšenie rozpustnosti pri znížení veľkosti častíc a zvýšení povrchovej plochy ustáva, ak veľkosť častíc dosiahne určitú hodnotu. Takže veľkosť častíc je kritická a nad určitú hodnotu sa uvoľňovanie pevných

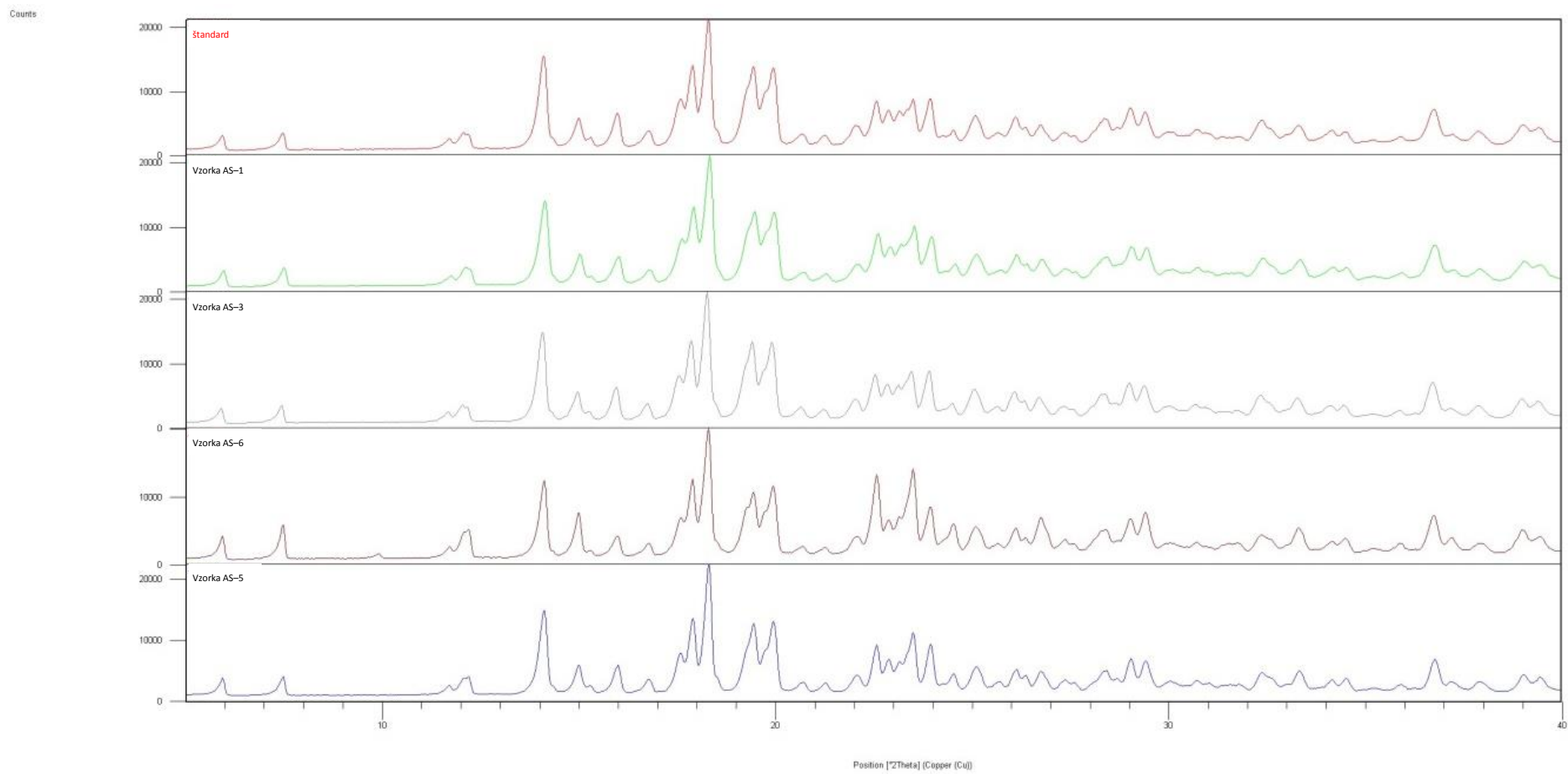
látok znižuje. Možno konštatovať, že tieto zmeny môžu vzniknúť z dôvodu prítomnosti elektrického náboja na častici, ktorý prevláda pri malých časticiach.^{141,142,143,144} Na základe uvedených skutočností zeta potenciál a veľkosť častíc boli vyhodnotené ako kritické pre vyhovujúce disolúcie.

Záver

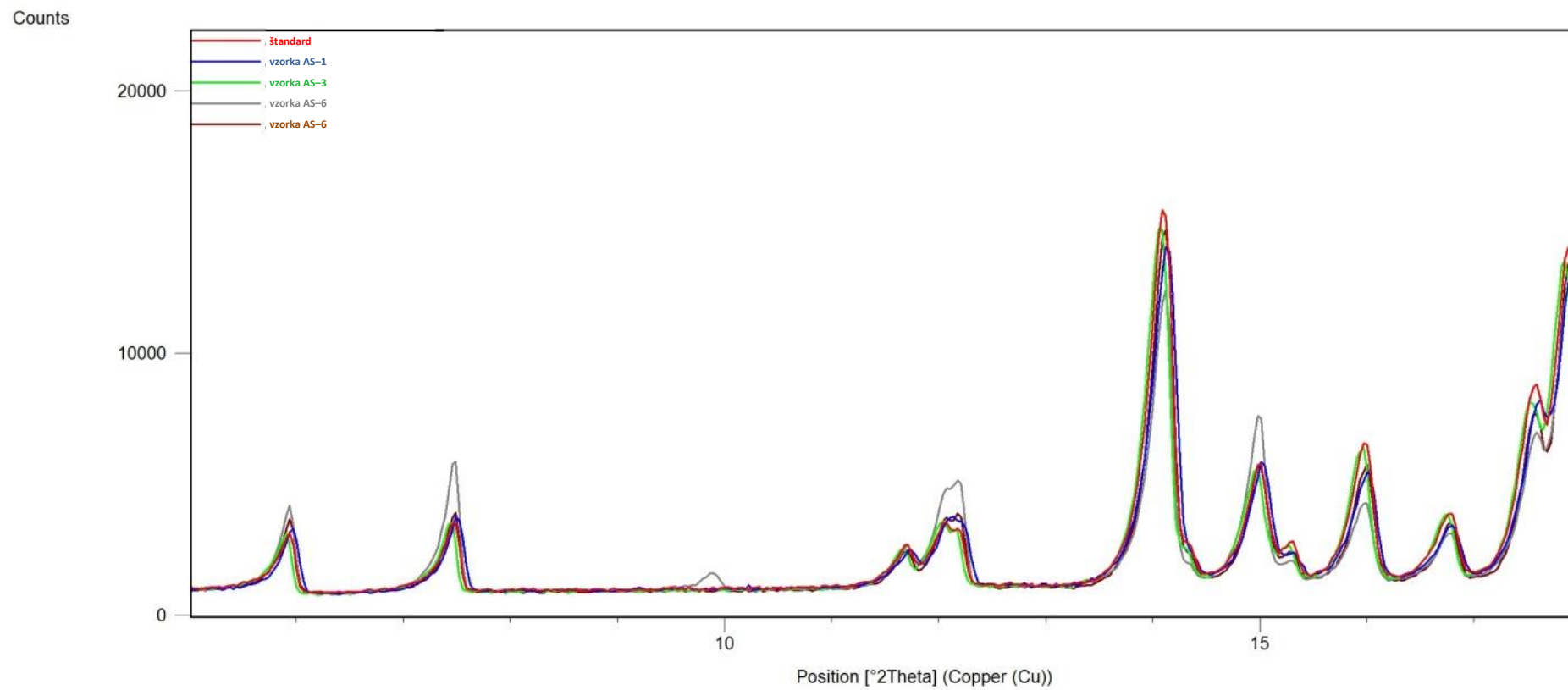
Zmena dodávateľa API „Z“ pre starší liek viedla k výsledkom, ktoré neboli v zhode so špecifikačným limitom pre test disolúcie (vzorky TS-1 a TS-2). Najprv sa vzorka API „Z“ od pôvodného dodávateľa (AS-3) a dvoch rôznych vzoriek API „Z“ od nového dodávateľa (AS-1 a AS-2) detailne analyzovali. Vzorka API „Z“ od pôvodného dodávateľa a z nej finálna perorálna lieková forma boli použité ako štandardy (AS-3, TS-3), a na základe parametrov tejto API „Z“ (vzorka AS-3), boli odporúčané niektoré kritériá. Výsledky analytického hodnotenia ďalších dvoch vzoriek/šarže API „Z“ (AS-4 a AS-5) a z neho vyrobených tabliet (vzoriek TS-4 a TS-5) potvrdili predpoklady a viedli k nasledujúcim odporúčaniam. Na základe vykonaného analytického testovania, zistenia a interpretácie vzťahov medzi množstvom uvoľneného množstva čistej API/API uvoľnenej z tabliet a stanovenia fyzikálno-chemických parametrov, veľkosť častíc, povrchová plocha, zeta potenciál, a pravdepodobne obsah vody, môžu byť považované za kritické parametre, ktoré ovplyvňujú rýchlosť disolúcie výsledného produktu. Možno zhrnúť, že pre vyhovujúce výsledky disolučného testu konečného produktu, by mala byť upravená a doplnená špecifikácia API „Z“ takto: zeta potenciál by mal byť v rozmedzí od 0 do -11 mV, limit veľkosti častíc by mal byť $x_{10} > 0,80 \mu\text{m}$ a $x_{99} < 13 \mu\text{m}$, špecifická povrchová plocha (BET), by mala byť v rozmedzí 19-32 m²/g a obsah vody v API by nemal byť vyšší ako 0,13%, za predpokladu, použitia rovnakých zariadení a experimentálnych podmienok merania.¹⁴⁵

Hodnotenie kvality API NIR spektrometriou

Vnadväznosti na predchádzajúce hodnotenia problémov API „Z“, boli dodávané novým dodávateľom šarže API „Z“, ktoré boli štandardne hodnotené vstupnou kontrolou. Jedna z dodaných šarží bola pri rutinnej kontrole stanovená metódou PXRD ako odlišná, nakoľko bola dodaná vzorka, ktorá nebola polymorfne čistá. Vybrané vzorky vyhovujúcich API „Z“, štandardu a nevyhovujúcej vzorky uvádzajú Obrázok 3.55 a Obrázok 3.56.



Obrázok 3.55 PXRD difraktogramy štandardu, vzoriek API „Z“ z predchádzajúceho hodnotenia (AS-1, AS-3, AS-5) a nevyhovujúca vzorka z novej dodávky AS-6



Obrázok 3.56 Výrez z PXRD difraktogramov z Obrázok 3.55

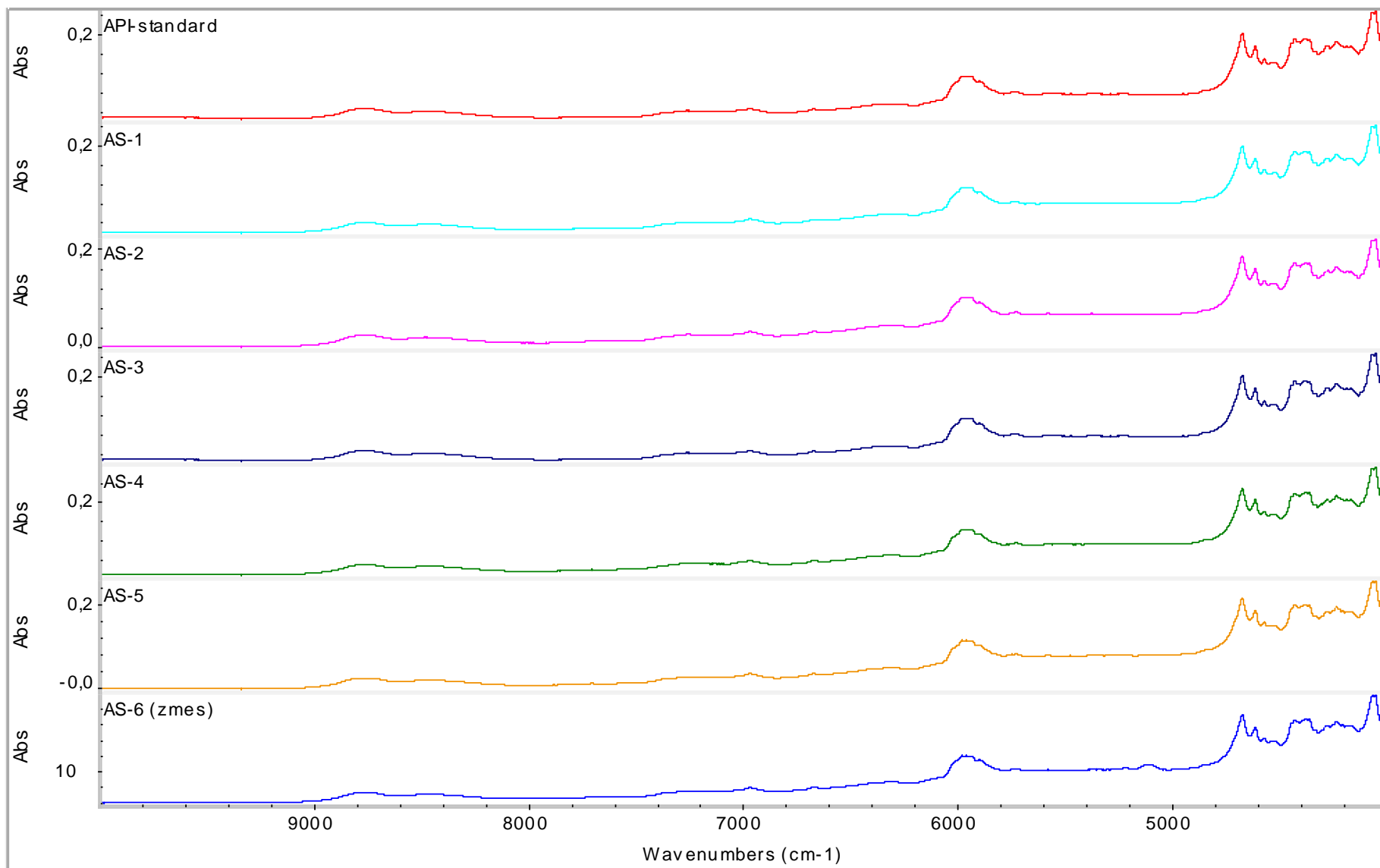
Pre komplexnosť riešenia problému, t. j. pre splnenie uvedených vstupných špecifikácií pre API „Z“ a pre hodnotenie finálnej liekovej formy bola pre zjednodušenie vstupných analýz navrhnutá možnosť hodnotenia metódou NIR, nakoľko by všetky parametre mohli byť zachytené v charaktere NIR spektier.

Na Obrázok 3.57 sú uvedené príklady nameraných spektier vyššie diskutovaných API „Z“ a aj API, ktorá nebola polymorfne čistá AS-6. Obrázok 3.58 predstavuje výrez z Obrázku 3.57, kde je v rozmedzí vlnočtov $5000 - 5300 \text{ cm}^{-1}$ dobre viditeľná zmena spektra u vzorky AS-6 v porovnaní s ďalšími spektrami vzoriek, ktoré mali vyhovujúci polymorf.

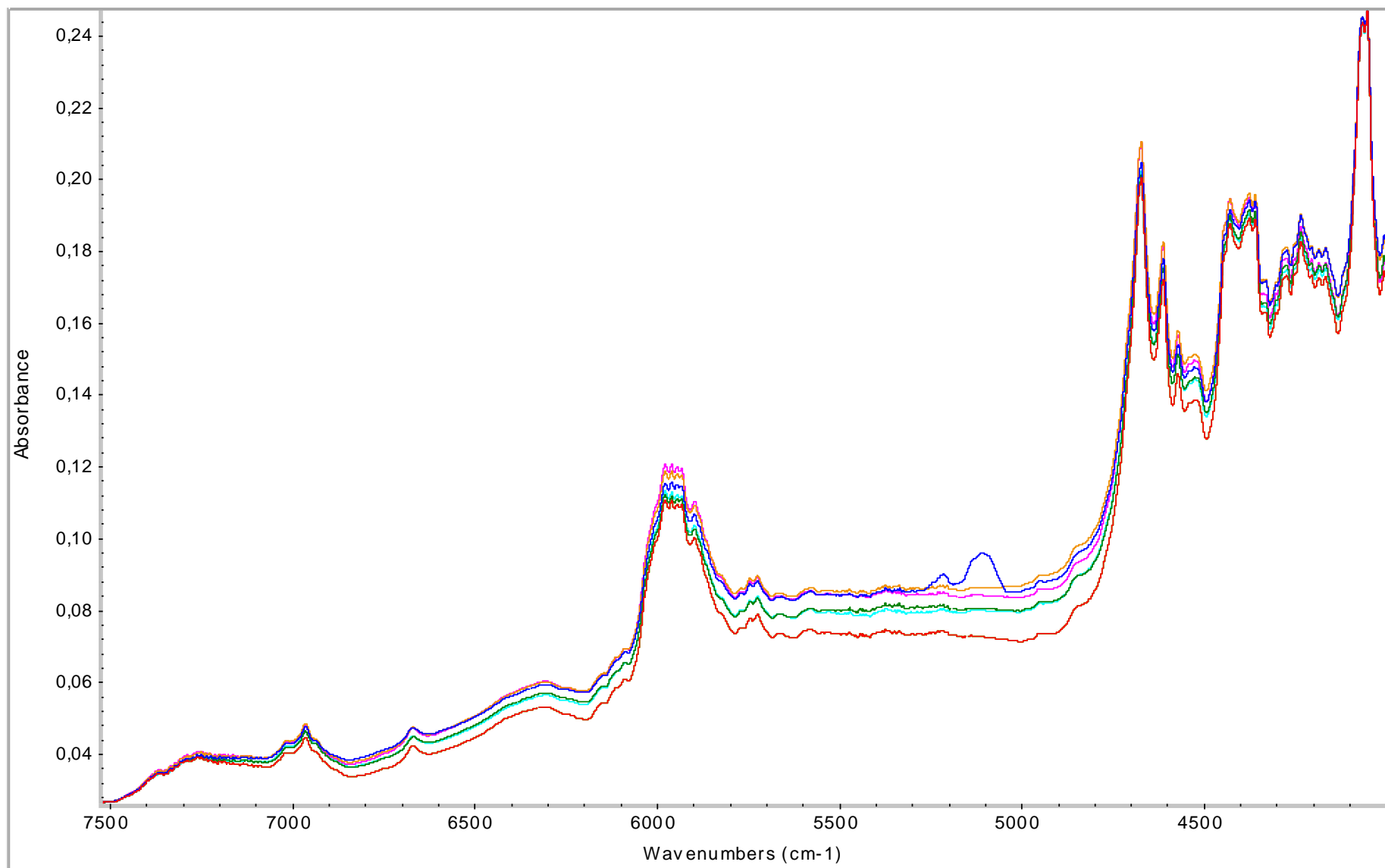
Súbor meraných vzoriek bol rozšírený aj o ďalšie šarže od nového dodávateľa, a šarže od predchádzajúceho dodávateľa získaných z protivzoriek, ktoré v minulosti poskytli vyhovujúci finálny produkt podľa platnej špecifikácie. Všetky namerané spektra boli vyhodnotené diskriminantnou analýzou pomocou softvéru TQ Analyst. Bolo zisťované, či je možné pomocou NIR spektrometrie rozlíšiť API „Z“ od oboch dodávateľov, vid' Obrázok 3.59, a ďalej rozlíšiť vzorky s požadovanou formou polymorfu od vzorky nie polymorfne čistej, vid' Obrázok 3.60.

V návaznosti na pozitívne výsledky bolo ďalej zisťované, či je možné postrehnúť rozdiely medzi API „Z“, ktoré by po galenickom spracovaní dali vyhovujúcu a nevyhovujúcu formuláciu. Obrázok 3.61 a Obrázok 3.62 zobrazuje celkovú blízkosť na základe fyzikálno-chemickej charakteristiky jednotlivých API vzhľadom k priebehu NIR spektier s prihliadnutím k všetkým vyššie hodnoteným parametrom. Diskriminantná analýza uvedených spektier bola vyjadrená ako 3D obrázok, kde je možné jasne odlíšiť tri skupiny vzoriek: API „Z“ (vzorka AS-6), ktorá nebola polymorfne čistá, API „Z“ (vzorky AS-1 a AS-2), ktoré poskytli nevyhovujúce, resp. hraničné výsledky a API „Z“ (vzorka AS-3 až AS-5), ktoré poskytli vyhovujúce výsledky. Pokiaľ sa zobrazenie vyjadří ako PC1:PC1:PC1 (Obrázok 3.61) sú projekcie spektier zoradené na uhlopriečke kocky, ak sa použije pre ďalšie osi PC2 a PC3 (Obrázok 3.62), zobrazenie sa zmení na priestorové.

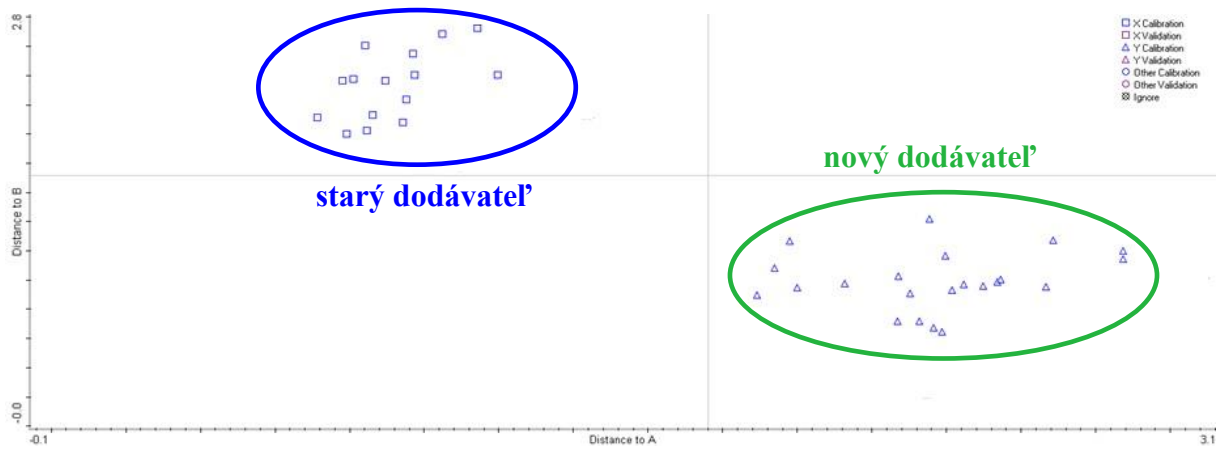
Na základe tohto znázornenia je možné predpokladať, že po vybudovaní dostatočne veľkej knižnice spektier, by bolo možné kvalitu API „Z“, teda skutočnosť, či po formulácii poskytne vyhovujúcu, resp. nevyhovujúcu liekovú formu z hľadiska platnej špecifikácie, zistiť počas vstupnej kontroly pri prijímaní substancie pomocou NIR spektrometrie.



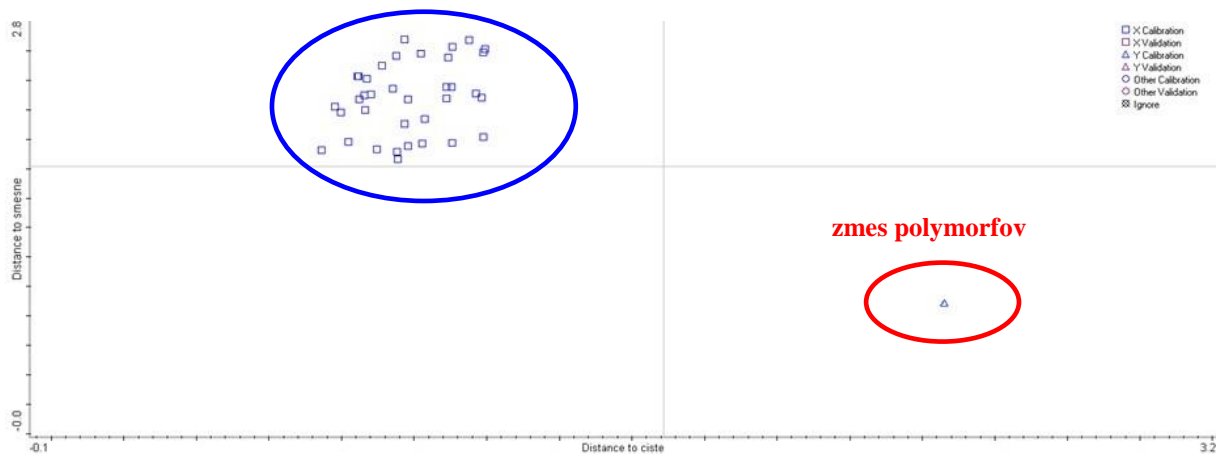
Obrázok 3.57 Príklady NIR spekter diskutovaných vzoriek



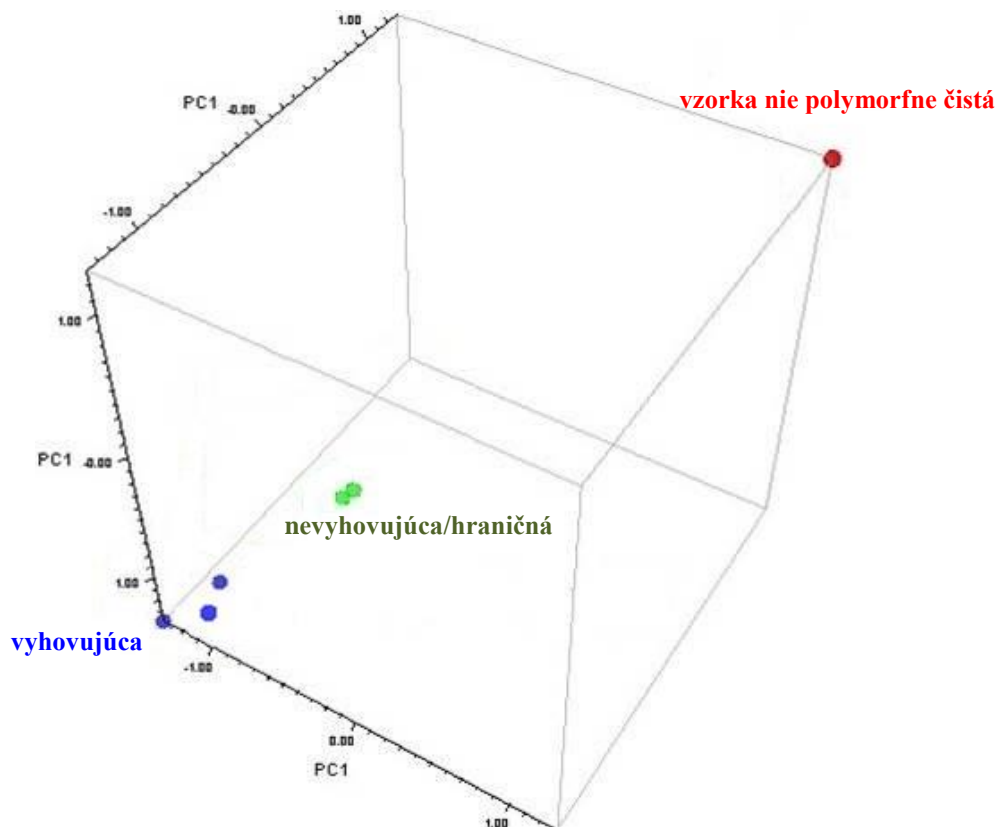
Obrázok 3.58. Výrez z NIR spektier z Obrázok 3.57(zmesná vzorka má modré spektrum)



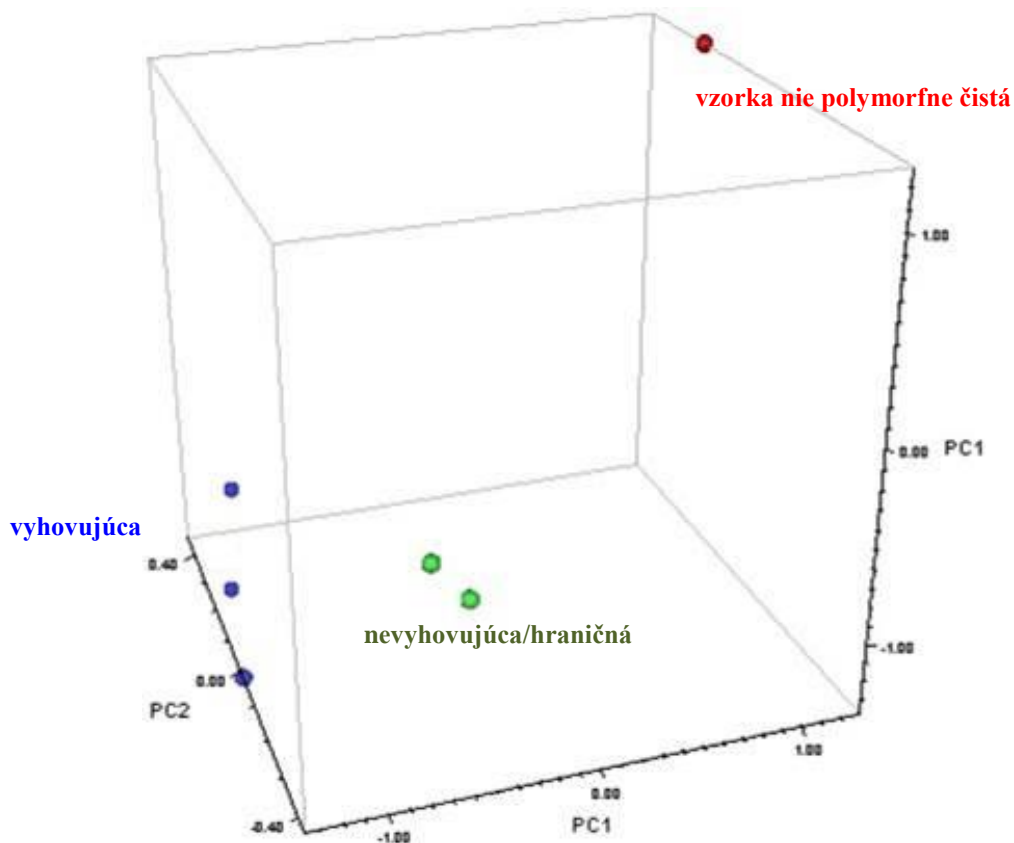
Obrázok 3.59 Rozlíšenie API od oboch výrobcov 2D zobrazenie bez vzorky AS-6



Obrázok 3.60 Rozlíšenie zmesnej vzorky AS-6 od čistých polymorfov v 2D zobrazení



Obrázok 3.61 Diskriminantná analýza NIR spektier vzoriek AS-1 až AS-6 vyjadrená ako 3D obrázok — projekcia spektier PC1:PC1:PC1



Obrázok 3.62 Diskriminantná analýza NIR spektier vzoriek AS-1 až AS-6 vyjadrená ako 3D obrázok — projekcia spektier PC2:PC1

4 ZÁVER

V teoretickej časti dizertačnej práce bol spracovaný prehľad legislatívy súvisiacej priamo s kontrolou kvality z pohľadu Európskej legislatívy, národných predpisov (zákonov, vyhlášky, a pod.), aplikácia predpisov správnej výrobnéj praxe a aktivít zjednocovacích procesov v rámci GMP rôznych oblastí systémov kvality — ako je kvalita, bezpečnosť, účinnosť — procesu harmonizácie. Ďalej som sa venovala regulácii v rámci farmaceutickej firmy z pohľadu požiadaviek dokumentácie kontroly kvality vstupných surovín a produktu, ktorá súvisí s bezpečnosťou pacienta.

Registrované liečivá a lieky, ktoré boli registrované pred niekoľkými rokmi, sa analyzujú metódami používanými v tom období. Preto naozaj kritické parametre, ktoré ovplyvňujú kvalitu finálneho produktu nemusia byť v špecifikácii definované. Pri zmene zdroja liečiva alebo pomocných látok je výhodné vedieť o kritických parametroch liečiva a prepojení na konečný dopad na finálny produkt.

Preto boli ďalej v teoretickej časti popísané jednotlivé metódy, ktoré boli aplikované v experimentálnej časti, a to od najjednoduchších, napr. stanovenie obsahu vody, cez modernejšie metódy separačné alebo spektrometrické, až po metódy najmodernejšie ako je napr. testovanie zrnčovitosti pevných substancií lebo metódy pevnej fázy (termická analýza, röntgenová difrakcia, analýza veľkosti a tvaru častíc, analýza povrchu a pod.).

Praktická časť práce popisuje experimenty, ktoré boli navrhnuté s cieľom sledovať a spoznať vplyvy excipientov na degradáciu liečiva a stabilitu finálnej liekovej formy, hodnotenie možnosti krížovej kontaminácie z predchádzajúcich procesov vo výrobe, identifikáciu neznámych nečistôt a stanovenie kritických parametrov liečiva s cieľom navrhnúť dostatočne robustnú špecifikáciu účinnej látky. Na analýzy boli použité metódy bežne používané v laboratóriách kontroly kvality, ako sú separačné metódy, stanovenie obsahu vody, disolúcie, tak aj sofistikovanejšie techniky.

Výsledky tejto dizertačnej práce sú rozpracované podľa typu hodnotenia kritických atribútov do prípadových štúdií a je ich možné zhrnúť do nasledujúcich bodov:

- Prípadová štúdia 1 — Hodnotenie excipientu — doplnkové rýchle vizuálne hodnotenie v porovnaní s hodnotením na fluorescenčnom spektrometri.

- Prípadová štúdia 2 — Vplyv excipientov na stabilitu liekovej formy — identifikácia neznámej nečistoty, ktorá rástla s časom počas stabilitného hodnotenia finálnej liekovej formy, následne sledovanie vplyvu pomocných látok, v pripravených binárnych zmesiach, na jej nárast metódami HPLC, DSC, príspevku vlhkosti a návrh možného riešenia.

- Prípadová štúdia 3 — Vplyv cudzorodých nečistôt na stabilitu liekovej formy — počas analýzy podľa predpísanej špecifikácie boli zistené nevyhovujúce výsledky neznámej nečistoty, ktorá rástla s časom v horizonte niekoľkých mesiacov veľmi rýchlo. Bola nastavená simulácia degradácie pre API a aj pre finálnu liekovú formu, počas vyšetrovania boli preverované ďalšie vzorky finálnej liekovej formy, primárne obaly (zátky, fľašky) a používané dezinfekčné prostriedky, ako aj excipienty a API použitej v predchádzajúcom prípravku, aby bola vylúčená kontaminácia z predchádzajúcej výroby. Avšak, žiadna analyzovaná vzorka pomocných látok ani API z predchádzajúceho prípravku nevykazovala v danom RRT pík. Taktiež pomocné látky ani dezinfekčné prostriedky nevykazovali vplyv na vyšetrovanú neznámu nečistotu v uvádzaných RRT na finálnu liekovú formu. Takisto bolo evidentné, že daná neznáma nečistota RRT 0,41 sa pred výrobou v použitej API nevyskytovala. Všetky dostupné vzorky z vyšetovaných obidvoch šarží vykazovali nárast vyšetrovanej nečistoty s RRT 0,41 po čase 1 mesiac od prvej analýzy. Pristúpilo sa k identifikácii neznámej nečistoty pomocou metódy LC-MS na hmotnostnom spektrometri Orbitrap. Na základe prevedenej identifikácie nečistôt bolo možné konštatovať, že API bola počas výroby finálnej liekovej formy vystavená pôsobeniu oxidačných činidiel s pravdepodobným radikálovým mechanizmom účinku.

- Prípadová štúdia 4 — Vplyv API na finálny produkt — stanovenie kritických parametrov API, zakúpeného od nového dodávateľa, tak aby aj finálna lieková forma vyhovovala platnej špecifikácii. Boli prevedené rozsiahle hodnotenia parametrov API, aby sa definovali tie parametre API, ktoré sú potrebné pre splnenie kritérií platnej špecifikácie finálneho prípravku ako sú stanovenia obsahu vody, hodnoty zeta potenciálu, špecifického povrchu a veľkosti častíc, hodnotenie elektrónovým mikroskopom. Na základe vykonaného analytického testovania, zistenia a interpretácie vzťahov medzi množstvom uvoľneného množstva čistej API, resp. API uvoľnenej z tabliet a stanovenia fyzikálno–chemických parametrov, veľkosť častíc, povrchová plocha, zeta potenciál a pravdepodobne obsah vody, môžu byť považované za kritické parametre, ktoré ovplyvňujú rýchlosť disolúcie výsledného produktu.¹⁴⁵ Pre komplexnosť riešenia problému, t.j. pre splnenie uvedených vstupných špecifikácii pre API a pre hodnotenie finálnej liekovej formy bola pre zjednodušenie vstupných analýz navrhnutá možnosť hodnotenia metódou NIR spektrometrie, nakoľko by všetky parametre mohli byť zachytené v charaktere NIR spektier.

Na záver je možné konštatovať, že vzhľadom na prísne legislatívne požiadavky, ktoré sú kladené na farmaceutických výrobcov je možné rozšírením analýz vstupných surovín, ako sú účinné látky a pomocné látky, spolu s aplikovaním moderných metód a postupov navrhovať a nachádzať riešenia na zabezpečovanie kvality liečiv a liekov a tak prispieť k bezpečnosti pacientov.

5 ZOZNAM PUBLIKOVANÝCH PRÁC

Publikácie vo vedeckých časopisoch:

BOJŇANSKÁ, Erika and **KALINA, Michal** and **PAŘÍZEK, Ladislav** and **BARTONÍČKOVÁ, Eva** and **OPRAVIL, Tomáš** and **VESELÝ, Michal** and **PEKAŘ, Miloslav** and **JAMPÍLEK, Josef**. Determination of Critical Parameters of Drug Substance Influencing Dissolution – A Case Study. *Biomed Res. Int.* 2014, vol. 2014, Article ID 929248 (9 pages), <http://www.hindawi.com/journals/bmri/2014/929248/>. [ISSN 2314-6133, IF₂₀₁₄ = 1,579]

Príspevky na konferenciách:

BOJŇANSKÁ, Erika and **JAMPÍLEK, Josef**. Applications of NIR Spectroscopy for Qualitative Evaluation of Substances. In Sborník *The 40th Symposium 'Chromatographic Methods of Investigating the Organic Compounds'*, Katowice – Szczyrk, Poľsko, 25.–28.05.2017, OS-3.

Vyžiadané prednášky:

BOJŇANSKÁ, Erika. Overview of Modern Methods in Quality Drug Assurance. In Sborník *The 2nd International Symposium and Workshop on Environment and Health (ISEH 2013)*, Ostrava, Česká republika, 6.–8.11.2013, s. 18, <http://ehss.eu/iseh2013/>. [ISBN 978-80-248-3240-1]

BOJŇANSKÁ, Erika. Dionex Ultimate 3000 v laboratóriu QC. Odborný seminár *Thermo Fisher Dionex Day 2015*, Amedis Bratislava, Slovensko, 13.05.2015.

BOJŇANSKÁ, Erika. Systém dokumentácie v prostredí SPKL. *Vzdelávacia aktivita 1 2067: „Inovačný kurz – aktuality v problematike dodržiavania správnej laboratórnej praxe“*. Slovenská zdravotnícka univerzita v Bratislave, Slovensko, 9.5.2016.

6 ZOZNAM POUŽITEJ LITERATÚRY

- ¹ *Zákon č. 362/2011 Zb. o liekoch a zdravotníckych pomôckach a o zmene a doplnení niektorých zákonov, § 2.* Zbierka zákonov SR.
- ² Štátny ústav pre kontrolu liečiv, SR. Dostupné z: http://www.sukl.sk/sk/liekopis/oznamy/oznam-o-ucinnosti-2.vydania-slovenskeho-farmaceutickeho-kodexu?page_id=4058 (18. 1. 2017).
- ³ European Pharmacopoeia 9th Edition, Supplement 9.1, Council of Europe, Strasbourg, 2017.
- ⁴ *Zákon č. 362/2011 Zb. o liekoch a zdravotníckych pomôckach a o zmene a doplnení niektorých zákonov, § 12.* Zbierka zákonov SR.
- ⁵ *Vyhláška č. 128/2012 Zb. Ministerstva zdravotníctva Slovenskej republiky z 21. marca 2012 o požiadavkách na správnu výrobnú prax a požiadavkách na správnu veľkodistribučnú prax.*
- ⁶ The International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use (ICH). Dostupné z: <http://www.ich.org/home.html> (25. 2. 2017).
- ⁷ ICH guideline Q8(R2): *Pharmaceutical Development*. The International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use, 2009.
- ⁸ ICH guideline Q9: *Quality Risk Management*. The International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use, 2005.
- ⁹ ICH guideline Q10: *Pharmaceutical Quality Systems*. The International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use, 2008.
- ¹⁰ ICH guideline Q11: *Development and Manufacture of Drug Substances (Chemical Entities and Biotechnological/Biological Entities)*. The International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use, 2011.
- ¹¹ ICH guideline Q12: *Technical and Regulatory Considerations for Pharmaceutical Product Lifecycle Management*. The International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use, 2014.

-
- ¹² Martin, G. P.; Barnett, K. L.; Burgess, C.; Curry, P. D.; Ermer, J.; Gratzl, G. S.; Hammond, J. P.; Herrmann, J.; Kovacs, E.; LeBlond, D. J.; LoBrutto, R.; McCasland-Keller, A. K.; McGregor, P. L.; Nethercote, P.; Templeton, A. C.; Thomas, D. P.; Weitzel, J. Lifecycle management of analytical procedures: Method development, procedure performance qualification, and procedure performance verification. *Pharmacoepial Forum*, **2013**, 39(5). Dostupné z: https://www.usp.org/sites/default/files/usp_pdf/EN/USPNF/revisions/lifecycle.pdf (20. 12. 2016).
- ¹³ Rahman, Z.; Xu, X.; Katragadda, U.; Krishnaiah, Y. S.; Yu, L.; Khan, M. A. Quality by design approach for understanding the critical quality attributes of cyclosporine ophthalmic emulsion. *Molecular Pharmaceutics*, **2014**, 11(3), 787–799.
- ¹⁴ Osborne, D. W. Impact of quality by design on topical product excipient suppliers, Part I: A drug manufacturer’s perspective. *Pharmaceutical Technology*, **2016**, 40(10), 38–43.
- ¹⁵ Colgan S.; Hanna-Brown, M.; Barnett, K.; Harrington B.; Graul, T.; Morgado, J.; Wrisley, L.; Szucs, R.; Slugget, G.; Steeno, G.; Pellet, J. Using quality by design to develop robust chromatographic methods. *PharmTech*, **2014**, 38(9), 48–64.
- ¹⁶ Szucs, R. Pharmaceutical analysis. In: *Liquid Chromatography: Fundamentals and Instrumentation*, Fanali, S.; Haddad, P. R.; Poole, C. F.; Schoenmakers, P.; Lloyd, D. (Eds.). Elsevier, Amsterdam, 2013, pp.431–453.
- ¹⁷ Reid, G. L.; Cheng, G.; Fortin, D. T.; Harwood, J. W.; Morgado, J. E.; Wang, J.; Xue, G. Reversed-phase liquid chromatographic method development in an analytical quality by design framework. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, **2013**, 36(18), 2612–2638.
- ¹⁸ Tattersall, P.; Li, L.; Wang, Q. A fast, generic and systematic approach to vHPLC impurity method development. *American Pharmaceutical Review*, **2010**, 13 (7). Dostupné z: <http://www.americanpharmaceuticalreview.com/Featured-Articles/114835-A-Fast-Generic-and-Systematic-Approach-to-vHPLC-Impurity-Method-Development/> (2. 2. 2017).
- ¹⁹ Erni F. Design Space and Control Strategy. Presentation at European Federation of Pharmaceutical Industries and Associations, **2006**. Dostupné z: http://www.pharma.gally.ch/pdf/design_space_and_control_strategy.pdf (2. 2. 2017).
- ²⁰ PEC-Americas. *Quality by Design (QbD) Sampling Guide*. IPEC-Americas, 2016. Dostupné z: www.ipeccamericas.org (2. 2. 2017).

-
- ²¹ Lanese, J. G. OOS: The last resort. *Pharmaceutical Formulation and Quality*, **2011**, 6/7, 30.
- ²² Shanley A. The cost of poor quality, too high a price? *Pharmaceutical Manufacturing*, **2012**. Dostupné z: <http://www.pharmamanufacturing.com/articles/2012/033> (2. 2. 2017).
- ²³ EudraLex – EU Legislation. Dostupné z: http://ec.europa.eu/health/documents/eudralex/index_en.htm (2. 2. 2017).
- ²⁴ Torbeck, L. D. Representative sampling. *Pharmaceutical Technology*, **2012**, 36(4). Dostupné z: <http://www.pharmtech.com/representative-sampling> (2. 2. 2017).
- ²⁵ Pifat, D. GLP vs GMP vs GCP. The biologics consulting group. Dostupné z: <https://www.pda.org/docs/default-source/website-document-library/chapters/presentations/southeast/glp-vs-gmp-vs-gcp.pdf?sfvrsn=6> (5. 2. 2017).
- ²⁶ Dohnal, J.; Jampílek, J.; Král, V.; Řezáčová, A. (Eds.). *Moderní přístupy k farmaceutické analýze*. VFU Brno, 2009.
- ²⁷ ICH guideline ICH Q2 (R1): *Analytical Validation*. The International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use, 1996.
- ²⁸ Miller, J. M.; Crowther, J. B. *Analytical Chemistry in a GMP Environment*. John Willey & Sons, New York, 2000.
- ²⁹ FDA – Center for Drug Evaluation and Research. *Guidance for Industry, Analytical Procedures and Method Validation*, USA, 2002.
- ³⁰ Rozet, E.; Dewé, W.; Ziemons, E.; Bouklouze, A.; Boulanger, B.; Hubert, P. Methodologies for the transfer of analytical methods: a review. *Journal of Chromatography B Analytical Technologies Biomedical Life Sciences*, **2009**, 877(23), 2214–2223.
- ³¹ Koplík, R. Analýza potravin a přírodních produktů – Voda. VŠCHT Praha. Dostupné z: <http://web.vscht.cz/~koplikr/Voda.pdf> (16. 1. 2017).
- ³² Podhájecký, P. Stanovení vody coulometrickou titrací. TechPark. Dostupné z: <http://www.tribotechnika.sk/tribotechnika-32011/stanoveni-vody-coulometrickou-titraci.html> (16. 1. 2017).
- ³³ EM spectrum. Dostupné z: https://commons.wikimedia.org/wiki/File:EM_spectrum.svg (16. 1. 2017).

-
- ³⁴ Matejka, P. Přehled technik — molekulová analýza. VŠCHT Praha. Dostupné z: <http://old.vscht.cz/anl/matejka/09-Raman-mikroRaman-07.pdf> (16. 1. 2017).
- ³⁵ Holzbecher, Z.; Churáček, J. Analytická chemie. SNTL Praha, 1987.
- ³⁶ National Physical Laboratory, Teddington, UK – Terahertz Spectroscopy Applications. Dostupné z: <http://www.npl.co.uk/electromagnetics/terahertz/> a http://www.npl.co.uk/upload/pdf/091217_terahertz_naftaly.pdf (12. 2.2017).
- ³⁷ Matějka P. a kol.: Charakterizace farmaceutických látek a jejich systémů se zaměřením na spektrální metody. VŠCHT Praha. Dostupné z: http://fchi-oppa.vscht.cz/uploads/AK-skripta/Charakterizace%20farmaceutickych%20latek%20a%20jejich%20systemu-upr_B.pdf (12. 2. 2017).
- ³⁸ *Měření vibračních spekter a Interpretace vibračních spekter*. Prednáškové materiály z kurzu, 19. – 30. 1. 2009, VŠCHT, Praha, 2009.
- ³⁹ Thermo Scientific, Application Note: 50771. Advantages of Fourier-Transform Near-Infrared Spectroscopy, **2006**. Dostupné z: <http://www.nicoletcz.cz/userfiles/file/ruzne/FourierTransformNIR.pdf> (12. 2.2017).
- ⁴⁰ Sulub, Y.; Wabuyele, B.; Gargiulo, P.; Pazdan, J.; Cheney, J.; Berry, J.; Gupta, A.; Shah, R.; Wu, H.; Khan, M. Real-time on-line blend uniformity monitoring using near-infrared reflectance spectrometry: A noninvasive off-line calibration approach. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **2009**, 49(1), 48–54.
- ⁴¹ Short, S. M.; Cogdill, R. P.; Wildfong, P. L.; Drennen, J. K.; Anderson, C. A. A near-infrared spectroscopic investigation of relative density and crushing strength in fourcomponent compacts. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, **2009**, 98(3), 1095–1109.
- ⁴² Rantanen, J.; Antikainen, O.; Mannermaa, J. P.; Yliruusi, J. Use of the near-infrared reflectance method for measurement of moisture content during granulation. *Pharmaceutical Development Technology*, **2000**, 5(2), 209–217.
- ⁴³ Popo, M.; Romero-Torres, S.; Conde, C.; Romañach, R. J. Blend uniformity analysis using stream sampling and near infrared spectroscopy. *AAPS Pharmaceutical Sciences and Technology*, **2002**, 3(3), 61–71.

-
- ⁴⁴ Peroza-Meza, C.; Santos, M. A.; Romañach, R. J. Quantitation of drug content in a low dosage formulation by transmission near infrared spectroscopy. *AAPS Pharmaceutical Sciences and Technology*, **2006**, 7(1), E206–E214.
- ⁴⁵ Perez-Ramos, J. D.; Findlay, W. P.; Peck, G.; Morris, K. R. Quantitative analysis of film coating in a pan coater based on in-line sensor measurements. *AAPS PharmSciTech*, **2005**, 6(1), E127–136.
- ⁴⁶ Mattes, R. A.; Root, D. E.; Birkmire, A. P. In-line process analysis of residual moisture in a fluid bed granulator-dryer using NIR spectroscopy. *Spectroscopy*, **2005**: 14. Dostupné z: www.spectroscopyonline.com (5. 2. 2017).
- ⁴⁷ Romero-Torres, S.; Huang, J.; Hernandez, P. Practical considerations in PAT analyzer selection: NIR vs.Raman. *American Pharmaceutical Review*, December **2009**. Dostupné z: <http://www.americanpharmaceuticalreview.com/Featured-Articles/117780-Practical-Considerations-on-PAT-Analyzer-Selection-Raman-vs-NIR-Spectroscopy/> (14. 2.2017).
- ⁴⁸ Meloun, M.; Militký, J. *Kompendium statistického zpracování dat*. Academia, Praha, 2002.
- ⁴⁹ Smith, L. I. A tutorial on principal components analysis. Dostupné z: http://www.cs.otago.ac.nz/cosc453/student_tutorials/principal_components.pdf (14. 2.2017).
- ⁵⁰ Dhanoa, M. S.; Lister, R. S.; Barnes, R. J. The link between multiplicative scatter correction (MSC) and standard normal variate (SNV) Transformations of NIR spectra. *Journal of Near Infrared Spectroscopy*, **1994**, 2(1), 43–47.
- ⁵¹ Martens, H.; Nielsen, J. P.; Engelsen, S. B. Light scattering and light absorbance separated by extended multiplicative signal correction. application to near-infrared transmission analysis of powder mixtures. *Analytical Chemistry*, **2003**, 75(3), 394–404.
- ⁵² Martens, H.; Stark, E. Extended multiplicative signal correction and spectral interference subtraction: New preprocessing methods for near infrared spectroscopy. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **1991**, 9(8), 625–635.
- ⁵³ Aragay, A. M.; Tauler, R. Comparison between different data pre-treatment methods in the analysis of forage samples using near-infrared diffuse reflectance spectroscopy and partial least-squares multivariate calibration method. *Analytica Chimica Acta*, **2003**, 484(1), 121–134.

-
- ⁵⁴ Pizarro, C.; Esteban-Díez, I.; Nistal, A. J.; González-Sáiz, J. M. Influence of data preprocessing on the quantitative determination of the ash content and lipids in roasted coffee by near infrared spectroscopy. *Analytica Chimica Acta*, **2004**, 509(2), 217–227.
- ⁵⁵ Huang, J.; Romero-Torres, S.; Moshgbar, M. Practical considerations in data pre-treatment for NIR and Raman spectroscopy. *American Pharmaceutical Review*, October **2010**. Dostupné z: <http://www.americanpharmaceuticalreview.com/Featured-Articles/116330-Practical-Considerations-in-Data-Pre-treatment-for-NIR-and-Raman-Spectroscopy/> (5. 2. 2017).
- ⁵⁶ Savitzky, A.; Golay, M. J. E. Smoothing and differentiation of data by simplified least squares procedures. *Journal of Analytical Chemistry*, **1964**, 36(8), 1627–1639.
- ⁵⁷ Martens, H.; Naes, T. *Multivariate Calibration*. John Wiley & Sons, New York, 1989.
- ⁵⁸ Martens, H.; Stark, E. Extended multiplicative signal correction and spectral interference subtraction: New preprocessing methods for near infrared spectroscopy. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **1991**, 9(8), 625–635.
- ⁵⁹ 2.2.21 Fluorimetry. In: *European Pharmacopoeia 9th Edition, Supplement 9.1*. Council of Europe, Strasbourg, 2017.
- ⁶⁰ WATERS – Identifying and quantitating compounds. Dostupné z: http://www.waters.com/waters/en_GB/Identifying-and-Quantitating-Compounds/nav.htm?cid=10049064&locale=en_GB (5. 2. 2017).
- ⁶¹ WATERS – HPLC column hardware. Dostupné z: http://www.waters.com/waters/en_GB/HPLC-Column-Hardware-/nav.htm?cid=10049068&locale=en_GB (5. 2. 2017).
- ⁶² McDonald, P. D. The quest for ultra performance in liquid chromatography: Origins of UPLC Technology. Waters Corporation, 2014.
- ⁶³ Phenomenex: Onyx — Monolithic silica HPLC columns. Dostupné z: <https://www.chromservis.eu/i/ONYX-phase?lang=CZ> (5. 2. 2017).
- ⁶⁴ Pharmaceutical mass spectroscopy instrumentation/Mass spectrometer equipment. *American Pharmaceutical Review*. Dostupné z: <http://www.americanpharmaceuticalreview.com/25305-Pharmaceutical-Laboratory-Equipment-and-Instruments/25313-Pharmaceutical-Mass-Spectroscopy-Instrumentation-Mass-Spectrometer-Equipment> (15. 5 2017).

-
- ⁶⁵ Hoffmann, E. D.; Stroobant, V. *Mass spectrometry: Principles and Applications*. J. Wiley, New York, 2001.
- ⁶⁶ Termo Fisher Scientific – Life science. Dostupné z: <https://www.thermofisher.com/sk/en/home/life-science/> (15. 2 2017).
- ⁶⁷ Termo Fisher Scientific – Overview of mass spectrometry for protein analysis. Dostupné z: <https://www.thermofisher.com/sk/en/home/life-science/protein-biology/protein-biology-learning-center/protein-biology-resource-library/pierce-protein-methods/overview-mass-spectrometry.html> (15. 2 2017).
- ⁶⁸ Zubarev, R. A.; Makarov, A. Orbitrap mass spectrometry. *Analytical Chemistry*, **2013**, 85, 5288–5296.
- ⁶⁹ Holčapek, M. Hmotnostní spektrometrie. Univerzita Pardubice. Dostupné z: http://holcapek.upce.cz/teaching/Mol_spek/Mol_spek_prednaska6_MS.pdf (15. 2 2017).
- ⁷⁰ WATERS – What is MS and How does it work? Dostupné z: http://www.waters.com/waters/en_GB/What-is-MS-and-How-does-it-Work%3F/nav.htm?cid=10073253&locale=en_GB (15. 2 2017).
- ⁷¹ Kloužková, A.; Zemenová, P.; Kloužek, J.; Pabst, W. *Termická analýza*. VŠCHT Praha, **2012**.
- ⁷² Pharmaceutical calorimeters. *American Pharmaceutical Review*. Dostupné z: <http://www.americanpharmaceuticalreview.com/25305-Pharmaceutical-Laboratory-Equipment-and-Instruments/25272-Pharmaceutical-Calorimeters/Compare/?compare=5821308,5821857,5821820,5822061,5821869&catid=25272> (15. 2. 2017).
- ⁷³ Šimek, M.; Grünwaldová, V.; Kratochvíl, B. Současné metody měření velikosti částic farmaceutických látek a jejich omezení. *Chemické listy*, **2014**, 108(1), 50–55.
- ⁷⁴ Komárek, P.; Rabišková, M. *Technologie léků*, 3. vydání. Galen, Praha, 2006.
- ⁷⁵ Crowder, T. M.; Hickey, A. J.; Louey, M. D.; Orr, N. *A Guide to Pharmaceutical Particulate Science*. Interpharm/CRC, New York, 2003.
- ⁷⁶ Okáčová, L.; Vetchý, D.; Franc, A.; Rabišková, M.; Kratochvíl, B. Zvýšení biodostupnosti těžce rozpustných léčivých látek jejich modifikací. *Chemické listy*, **2010**, 104(1), 21–26.

-
- ⁷⁷ Doležal, T.; Hausner, T. Bioekvivalence studie s novými antihypertenzivy. *Vnitřní lékařství*, **2005**, 51(1), 115–118.
- ⁷⁸ Allen, T. *Particle Size Measurement*, 5. vydání. Chapman & Hall, New York 1997.
- ⁷⁹ Chattopadhyay, P.; Shekunov, B. Y.; Yim, D.; Cipolla, D.; Boyd, B.; Farr, S. Production of solid lipid nanoparticle suspensions using supercritical fluid extraction of emulsions (SFEE) for pulmonary delivery using the AERx system. *Advanced Drug Delivery Reviews*, **2007**, 59(6), 444–453.
- ⁸⁰ Shewhart, W. *Statistical Method from the Viewpoint of Quality Control*. Dover, New York, 1986.
- ⁸¹ 2.9.37 Optical microscopy. In: *European Pharmacopoeia 9th Edition, Supplement 9.1*. Council of Europe, Strasbourg, 2017.
- ⁸² Martin, A. *Physical Pharmacy*. Lea & Febiger, Philadelphia, 1993.
- ⁸³ Newman, A. W.; Brittain, H. G. *Physical Characterization of Pharmaceutical Solids*. Marcel Dekker, New York, 2002.
- ⁸⁴ Malvern – Laser diffraction particle size distributions from nanometers to millimeters. Dostupné z: http://www.malvern.com/LabEng/technology/laser_diffraction/laser_diffraction.htm (18. 4. 2017)
- ⁸⁵ Zakrzewski, A.; Zakrzewski, M. *Solid State Characterisation of Pharmaceuticals*. Analytics, Danbury, 2006.
- ⁸⁶ Tinke, A. P.; Vanhoutte, K.; Vanhoutte, F.; De Smet, M.; De Winter, H. Laser diffraction and image analysis as a supportive analytical tool in the pharmaceutical development of immediate release direct compression formulations. *International Journal of Pharmaceutics*, **2005**, 297(1/2), 80–88.
- ⁸⁷ Garekani, H. A.; Ford, J. L.; Rubinstein, M. H.; Rajabi-Siahboomi, A. R. Formation and compression characteristics of prismatic polyhedral and thin plate-like crystals of paracetamol. *International Journal of Pharmaceutics*, **1999**, 187(1), 77–89.
- ⁸⁸ Nic, M.; Jirat, J.; Kosata, B.; Jenkins, A. Specific surface area. In: *IUPAC – Compendium of Chemical Terminology*, 2nd ed., McNaught, A. D.; Wilkinson, A. (Eds.). Blackwell Scientific Publications, Oxford, 1997. On-line corrected version. Last update: 2014-02-24, version: 2.3.3. Dostupné z: <https://goldbook.iupac.org/html/S/S05806.html> (14. 4. 2017).

-
- ⁸⁹ Sing, K. S. W. Adsorption methods for the characterization of porous materials. *Advances in Colloid and Interface Science*, **1998**, 76/77, 3–11.
- ⁹⁰ Particle Analytical ApS. – Analyses for the pharmaceutical industry. Dostupné z: <http://particle.dk> (14. 4. 2017).
- ⁹¹ 2.9.26. Specific surface area by gas adsorption. In: *European Pharmacopoeia 9th Edition, Supplement 9.1*. Council of Europe, Strasbourg, 2017.
- ⁹² AZo Materials – Using specific surface area measurement for pharmaceutical materials. 2014. Dostupné z: <http://www.azom.com/article.aspx?ArticleID=11303> (15. 4. 2017).
- ⁹³ Micromeritics Analytical Services – Surface area. Dostupné z: <http://www.particletesting.com/Services-Provided/Surface-Area.aspx> (18. 4. 2017).
- ⁹⁴ Micromeritics Instrument Corporation – Gas adsorption theory. Dostupné z: http://www.particletesting.com/Repository/Files/Gas_Adsorption_Theory_poster.pdf (19. 4. 2017).
- ⁹⁵ Zisman, W. A. Relation of the equilibrium contact angle to liquid and solid constitution. In: *Contact Angle, Wettability, and Adhesion – Advances in Chemistry*, vol. 43. American Chemical Society, Washington, D.C., 1964, Chapter 1, pp. 1–51.
- ⁹⁶ Kedroňová, E. Měření kontaktního úhlu sedící kapky jako metoda charakterizace povrchu. Fakulta chemická, VUT Brno. Revize 10. 3. 2012. Dostupné z: <http://www.chempoint.cz/mereni-kontaktneho-uhlu-sedici-kapky-jako-metoda-charakterizace-povrchu> (14. 4. 2017).
- ⁹⁷ Attwood, D.; Florence, A. T. *Surfactant Systems Their Chemistry, Pharmacy and Biology*. Chapman & Hall, New York, 1983, pp. 28–37.
- ⁹⁸ Gao, L.; McCarthy, T. J. Contact angle hysteresis explained. *Langmuir*, **2006**, 22(14) 6234–6237.
- ⁹⁹ Janssen, D.; De Palma, R.; Verlaak, S.; Heremans, P.; Dehae, W. Static solvent contact angle measurements, surface free energy and wettability determination of various self-assembled monolayers on silicon dioxide. *Thin Solid Films*, **2006**, 515(4), 1433–1438.
- ¹⁰⁰ Skeist, I. *Handbook of Adhesives*, 3rd ed. Chapman & Hall, New York, 1989.
- ¹⁰¹ Buvailo, A.; Xing, Y.; Keuleyan, S.; Prakash, V.; Eftekhari-Bafrooei, A.; Borguet, E. Contact angle measurements using a simplified experimental setup. *Journal of Chemical Education*, **2010**, 87(12), 1403–1407.

-
- ¹⁰² Garbassi, F.; Morra, M.; Occhiello, E. *Polymer Surfaces from Physics to Technology*, revised and updated ed. John Wiley & Sons, New York, 1997.
- ¹⁰³ Yeh, K. Y.; Chen, L. J. Contact angle hysteresis on regular pillar-like hydrophobic surfaces. *Langmuir*, **2008**, 24(1), 245–251.
- ¹⁰⁴ Arkles, B. *Hydrophobicity, hydrophilicity and silane surface modification*. Gelest, USA, 2006. Dostupné z: <http://www.gelest.com/wp-content/uploads/Hydrophobicity.pdf> (14. 4. 2017).
- ¹⁰⁵ Röntgenová prášková difrakčná analýza. 38. kolokvium „Struktura 2011“, 20.–23. 6. 2011, Turnov. Krystalografická společnost & Regionální komitét IUCr. Dostupné z: <http://www.xray.cz/xray/csca/kol2011/kurs/dalsi-cteni/sucha/rtg.pdf> (19. 4. 2017).
- ¹⁰⁶ Kratochvíl, B.; Hušák, M.; Korotková, E. I.; Jegorov, A. Význam stanovení krystalových struktur pro farmacii, *Chemické. Listy*, **2016**, 110(1), 40–47.
- ¹⁰⁷ ICH guideline Q6A: *Specifications*. The International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use, 1999.
- ¹⁰⁸ Moore, D. M.; Reynolds, R. C. *X-Ray Diffraction and the Identification and Analysis of Clay Minerals*, 2nd ed. Oxford University Press, New York, 1997.
- ¹⁰⁹ Poppe, L. J.; Paskevich, V. F.; Hathaway, J. C.; Blackwood, D. S. A Laboratory Manual for X-Ray Powder Diffraction. U.S. Geological Survey Open-File Report 01-041, Dostupné z: <https://pubs.usgs.gov/of/2001/of01-041> (22. 3. 2017).
- ¹¹⁰ Myers, H. P. *Introductory Solid State Physics*. Taylor & Francis, Philadelphia, 2002.
- ¹¹¹ Poppe, L. J.; Paskevich, V. F.; Hathaway, J. C.; Blackwood, D. S. X-Ray Diffraction Primer. U.S. Geological Survey Open-File Report 01-041, Dostupné z: <http://pubs.usgs.gov/of/2001/of01-041/htmldocs/images/beam.jpg> (15. 4. 2017).
- ¹¹² David, W.; Shankland, I. F. K. Structure determination from powder diffraction data. *Acta Crystallogr. A* **2008**, 64(1), 52–64.
- ¹¹³ Berti, G.; Leonardo, L.; Carrara, R. A peaks analysis method in X-ray powder diffractometry. *Rendiconti della Societa Italiana di Mineralogia e Petrologia*, **1984**, 39(1), 115–122.

-
- ¹¹⁴ Poppe, L. J.; Paskevich, V. F.; Hathaway, J. C.; Blackwood, D. S. X-Ray Diffraction Primer. U.S. Geological Survey Open-File Report 01-041. Dostupné z: <http://pubs.usgs.gov/of/2001/of01-041/htmldocs/images/xrdschem.jpg> (15. 4. 2017).
- ¹¹⁵ Whittingham, M. S. X-Ray analysis of a solid. Dostupné z: <https://www.physics.rutgers.edu/grad/506/xrays/xray.html> (15. 4. 2017).
- ¹¹⁶ Dissolution <711>. In: *United States Pharmacopeia and The National Formulary (USP–NF)*. The United States Pharmacopeial Convention, 2017.
- ¹¹⁷ ICH guideline Q4 Annex7(R2): *Dissolution Test General Chapter*. The International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use, 2010.
- ¹¹⁸ Čulen, M.; Tuszyński P. K.; Polak, S.; Jachowicz, R.; Mendyk, A.; Dohnal, J. Development of in vitro-in vivo correlation/relationship modeling approaches for immediate release formulations using compartmental dynamic dissolution data from “Golem”: A novel apparatus. *BioMed Research International*, **2015**, 2015, 328628.
- ¹¹⁹ U.S. Food & Drug Administration – The Biopharmaceutics Classification System (BCS) Guidance. Page Last Updated: 02/10/2016. Dostupné z: <https://www.fda.gov/aboutfda/centersoffices/officeofmedicalproductsandtobacco/cder/ucm128219.htm> (20. 4. 2017).
- ¹²⁰ Viegas, T. X.; Curatella, R. U.; Van Winkle, L. L.; Brinker, G. Measurement of intrinsic drug dissolution rates using two types of apparatus. *Pharmaceutical Technology*, **2001**, 25(6), 44–53.
- ¹²¹ Brown, C. K.; Chokshi, H. P.; Nickerson, B.; Reed, R. A.; Rohrs, B. R.; Shah, P. A. Acceptable analytical practices for dissolution testing of poorly soluble compounds. *Pharmaceutical Technology*, **2004**, 12, 56–65.
- ¹²² Martinez, M. N.; Amidon, G. L. A mechanistic approach to understand the factors affecting drug absorption: A review of fundamentals. *Journal of Pharmacokinetics and Pharmacodynamics*, **2002**, 42(6), 620–643.
- ¹²³ *Dissolution Testing and Analysis*. Dissolution Systems Source Book 2014-2015 Ed. Agilent Technologies, 2014. Dostupné z: https://www.agilent.com/cs/library/catalogs/public/5991-4049EN_Source_Book.pdf (15. 4. 2017).

-
- ¹²⁴ Quality Lab Accessories. Dostupné z: <http://www.labhut.com/media/wysiwyg/apparatus-1-graphic.gif> (15. 4. 2017).
- ¹²⁵ Quality Lab Accessories. Dostupné z: <http://www.labhut.com/media/wysiwyg/Apparatus-2-diagram2.jpg> (15. 4. 2017).
- ¹²⁶ Beyssac, E.; Lavigne, J. Dissolution study of active pharmaceutical ingredients using the flow through apparatus USP 4. *Dissolution Technologies*, **2005**, 5, 23–25. Dostupné z: http://www.dissolutiontech.com/DTresour/200505Articles/DT200505_A04.pdf (15. 4. 2017).
- ¹²⁷ Malvern Zetasizer nano ZS. MFF UK, Praha. Dostupné z: <http://www.xray.cz/kfkl-osa/eng/zetasizer/zeta.htm> (15.4.2017).
- ¹²⁸ Malvern Zetasizer Nano ZS – Zeta potenciál zeta. MFF UK, Praha. Dostupné z: <http://www.xray.cz/kfkl-osa/eng/zetasizer/zeta.h18.gif> (15. 4. 2017).
- ¹²⁹ Malvern Zetasizer Nano ZS – Zeta potenciál zeta. MFF UK, Praha. Dostupné z: <http://www.xray.cz/kfkl-osa/eng/zetasizer/zeta.h19.gif> (15. 4. 2017).
- ¹³⁰ Malvern – Overview Zetasizer nano ZS. Dostupné z: <http://www.malvern.com/en/products/product-range/zetasizer-range/zetasizer-nano-range/zetasizer-nano-zs/> (20.4.2017).
- ¹³¹ Malvern – How are the peak statistics calculated in the zetasizer software? Dostupné z: <http://www.malvern.com/en/support/resource-center/faq/FAQ160617peakstatistics.aspx> (20. 4. 2017).
- ¹³² Malvern – Zeta potential in 30 minutes, technical note. Dostupné z: www.malvern.com (20. 4. 2017).
- ¹³³ 2.5.32 Water: Microdetermination. In: *European Pharmacopoeia 9th Edition, Supplement 9.1*. Council of Europe, Strasbourg, 2017.
- ¹³⁴ Brunauer, S.; Emmett, P. H.; Teller, E. Adsorption of gases in multimolecular layers, *Journal of the American Chemical Society*, **1938**, 60, 309–319.
- ¹³⁵ Dimeticonum 01/2017:0138. In: *European Pharmacopoeia 9th Edition, Supplement 9.1*. Council of Europe, Strasbourg, 2017.
- ¹³⁶ Nassar, A. F. *Biotransformation and Metabolite Elucidation of Xenobiotics: Characterization and Identification*. John Wiley & Sons, Hoboken, 2011.

-
- ¹³⁷ Yuan, Y.; Lee, T. R. Contact angle and wetting properties. In: *Surface Science Techniques*. Bracco, G.; Holst, B. (Eds.). Springer Series in Surface Sciences, Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg, 2013, 51, 3–34.
- ¹³⁸ Russel, W. B.; Saville D. A.; Schowalter, W. R. *Colloidal Dispersions*. Cambridge University Press, Cambridge, 1989.
- ¹³⁹ Chu, K. R.; Lee, E.; Jeong S. H.; Park E. S. Effect of particle size on the dissolution behaviors of poorly water-soluble drugs. *Archives of Pharmacal Research*, **2012**, 35, 1187–1195.
- ¹⁴⁰ Phadke, D. S.; Eichorst, J. L. Evaluation of particle size distribution and specific surface area of magnesium stearate. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, **1991**, 17, 901–906.
- ¹⁴¹ Aulton, M. E.; Taylor, K. *Aulton's Pharmaceutics: The design and Manufacture of Medicines*, 4th ed., Churchill Livingstone / Elsevier, London, 2013.
- ¹⁴² Finholt, P. Influence of formulation on dissolution rate. In: *Dissolution Technology*, Leeson, L.J.; Catensen, T.J. (Eds.), APhA, Washington D.C., 1974, p. 108.
- ¹⁴³ Behera, A. L.; Sahoo, S. K.; Patil, S. V. Enhancement of solubility: A pharmaceutical overview. *Der Pharmacia Lettre*, **2010**, 2, 310–318.
- ¹⁴⁴ Allen, L. V.; Ansel, H. C. *Ansel's Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems*, 10th Ed. Kluwer, Baltimor, 2013.
- ¹⁴⁵ Bojňanská, E.; Kalina, M.; Pařízek, L.; Bartoníčková, E.; Opravil, T.; Veselý, M.; Pekař, M.; Jampílek, J. Determination of critical parameters of drug substance influencing dissolution – a case study. *BioMed Research. International.*, **2014**, 2014, 929248.