

【総説】

子供や高齢者に優しい医薬品剤形の開発研究 —ラマン分光法を用いたカフェイン錠剤の非破壊品質管理—

大塚 誠

Musashino University Creating Happiness Incubation 研究員 武蔵野大学 薬学部 教授

竹島 里奈

武蔵野大学 大学院薬科学研究科

服部 祐介

Musashino University Creating Happiness Incubation 研究員 武蔵野大学 薬学部 講師

真名垣 聡

Musashino University Creating Happiness Incubation 研究員 武蔵野大学 工学部 准教授

要約

本研究では、水に溶けにくい原薬を子供や高齢者に優しい医薬品剤形に適用するために、溶けやすい原薬結晶へと調製する工程を非破壊で品質管理する方法を開発した。後方散乱ラマン分光法(BRS)と透過ラマン分光法(TRS)を用いて、カフェイン錠剤中の水和物量を測定することで、水に溶けにくいカフェイン水和物(CAH)の脱水し、水に溶けやすいカフェイン無水物(CAA)にする過程を解析した。TRS は、錠剤中の活性医薬成分(API)の含有量を同定する非常に有効な手法であるが、BRS は検出可能な範囲がレーザー光の深度によって制限されるという課題がある。結果は、TRS, BRS 共に部分最小二乗回帰分析モデルは水和物と無水物間の結晶構造の違いを評価することで医薬品の品質管理ができることが示された。

1. はじめに

超高齢化少子化社会を迎え、我々の「しあわせ」な生活の土台である「健康」を支える医療・介護の重要性は益々高まっている。子供から老人までの人生全般を安心して健やかな生活を過ごすことができる社会を実現するためには、様々な疾病や健康障害に対応する有効で安全な医薬品を迅速で安価に提供する必要がある。一方で、現在、新規に開発される化合物の多くは水に対して難溶解性であ

ることから、ヒトへの薬物の吸収が極めて困難であり、新規医薬品の開発の大きな障害となっている。多くの医薬品原薬は、同じ化合物であっても結晶構造が異なる複数の結晶状態が存在する、それらの結晶を結晶多形と呼ぶ。結晶性固体として存在する医薬品化合物は、その結晶多形の構造、熱力学的安定性に依存して安定性などの物性が異なる。また水和物結晶などの溶媒和物は、無水物結晶に対して疑似結晶多形と言われ、医薬品の溶出性や生物学的利用能の相違に影響するため重要である¹⁻³。そうした疑似結晶多形間の転移は医薬品製造過程において誘発されることがあり、厳密な管理と制御が必要である⁴⁻⁶。また、難溶性薬物の溶解性改善の手法として結晶多形を用いることが有効であることが知られている。つまり多形転移の管理と制御を実現することは、溶けやすく、吸収されやすい原薬結晶として使用できる。それは、速放性製剤や徐放性製剤など高齢者や子供などの消費者のニーズに応えた飲みやすい剤形開発の一助となると考えられる。

アメリカ食品医薬品局(Food and Drug Administration ; FDA)は、有効で安全な、より良い品質の医薬品を製造工程管理するために Process analytical technology (PAT)という分析手法を提唱している。これまでは、製造工程中に製造物の一部を回収し品質試験をすることが一般的であった。不適合の製造物は廃棄されており、これを一因として医薬品を起源とする化学物質が河川や下水処理水等の水環境中で広範囲に存在することが報告されている^{7,8}。PATを導入することは、製造工程の設計、分析によって廃棄薬品が減り、最終製品の品質を保証することを可能し、より効率的な製造工程の設計により、安全で安価な医薬品を実現することができる点からも注目を集めている⁹⁻¹⁷。

本研究では、カフェイン水和物(CAH)を医薬品原薬のモデル化合物とした。CAHは低湿度環境下で無水カフェインに転移することが単結晶 X線回折、近赤外(Near-infrared : NIR)、赤外(Infrared : IR)、ラマン分光法により確認されている^{18-23,14}。また、錠剤中の活性医薬成分(API)含量を再現性良く定量するために、NIRの透過法が使用されているが、^{24,28,29}その測定感度は、化学的及び物理的要因に依存し、密度や水分の影響を受け易いことから、その有用性が剤形に左右される。小児や高齢者などの嚥下困難な患者に処方する製剤として口腔内即崩錠が使用されるが、湿式打錠で圧縮成形する製造法は、水分を多く含むために NIR

による分析は不適であり、代替技術が求められる。一方、錠剤中の API 含有量を定量する代替技術として注目されている透過ラマン分光法(Transmission Raman spectroscopy ; TRS)は、^{15,25-26,30,31} 結晶多形を定量することにも有効であると証明されている^{25,26}。本研究では、TRS を用い湿式打錠工程での錠剤中の CAH 結晶量を測定することにより、吸収性の良いカフェイン無水物(CAA)結晶の製造工程をラマン分光法により計測し、品質の高い医薬品原薬を恒常的に調製することにより、高齢者や小児に有効で安心安全な医薬品を迅速に安価で提供することを目的とする。

2. 実験方法

(1) 試料

カフェイン水和物(CAH)は和光純薬工業株式会社(Osaka, Japan)から購入した。分子構造は Fig. 1 に示す。CAH 粉末は相対湿度 95%以上の高湿度条件下にて保管することで調製した。

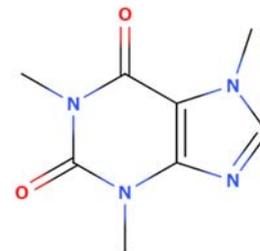


Fig.1. カフェインの分子構造.

(2) 含水量の測定

約 10 mg の CAH 粉末を示差熱分析(DTA)及び熱重量分析(TG)装置(TG-8120, Rigaku, Tokyo, Japan)を用いて、20°Cから 200°Cまで 5°C/min の速度で加温させた。加温前後の重量差から CAH の含水率を測定した。

(3) 錠剤の作成

脱水速度を観察するために、厚さ及び重量の異なる錠剤を 5 種類作成した。錠剤成形には油圧式単発打錠機(HANDTAB-100, Ichihashi Seiki, Kyoto, Japan)を用い、臼と平杵は直径 8 mm のものを使用した。錠剤の厚さを 2.6 mm, 3.0 mm, 3.2 mm, 3.5 mm, 4.0 mm とするために、試料の重量をそれぞれ 150 mg, 175mg, 200 mg, 235 mg, 265 mg と変化させ、100 Mpa の一定圧力で圧縮した。圧縮成形後は、錠剤を秤量し、乾燥させるサンプルについては 70°Cの乾燥機中で 3 日または 8 日乾燥させた。実験には合計で 45 錠のサンプルを使用した。

未乾燥錠剤中の水分量(M_{init})は CAH 粉末の TG 測定によって得られたものだが、乾燥時間 t における乾燥錠剤中の水分量(M_t)は以下の式を用いて求めた。

$$M_t = M_{init} - LOD. \quad (1)$$

(4) ラマン分光測定

BRS 及び TRS の錠剤測定にはそれぞれオプティカルファイバークラウドプローブを用いたラマン分光器 (Raman-HR-TEC, StellarNet, FL, USA) と TRS100 (Cobalt Light Systems, Oxfordshire, UK)を使用した。BRS の検出器には冷却 CCD 検出器を使用し、レーザー光は励起波長 785 nm のダイオードレーザー(Lab-LS-785, Innovative Photonic Solutions, Monmouth Junction, NJ)を用いて 100mW で出力された。レーザーの焦点径は 0.5 mm に設定した。スペクトル測定は積算回数 5 回/25 秒で行われた。TRS は自動サンプルトレイにサンプルを並べ、トレイを移動させることで測定を行った。励起波長 830 nm のダイオードレーザーを使用して 650 mW (51.7 mW / mm²)でレーザー光を出力した。そのとき焦点径は 4 mm とした。測定は積算回数 3 回/0.9 秒で行われた。CAH 錠剤中の水分含有量の定量校正モデルは、ケモメトリックスソフトウェア(pirouette Ver. 4.5, Infometrix, Woodinville, WA)を用いた部分最小二乗回帰 Partial least square regression (PLSR)分析によって構築された。

3. 結果

TG の測定結果より、CAH 粉末の水分含有量は 6.35wt%であり、これは 42mol%に相当することが確認された。得られた粉末中の水分含有率に基づいて各錠剤の乾燥前に含まれる水分量を計算した。また、乾燥後の錠剤中水分量は eq. (1)を用いて算出した。これらの結果は Table 1 に示した。

Fig. 2 には BRS 及び TRS の測定結果によるラマンスペクトルを示した。両者ともカフェインの特徴的なピークを示しており、乾燥に伴い無水物に特徴的なピークが増強されることが確認された。初期及び 8 時間乾燥錠剤間の差スペク

Table 1. TG と LOD の結果から得られた厚みごとの平均錠剤水分含量

乾燥時間 (h)	水分含量(mg/tablet)				
	錠剤の厚み (mm)				
	2.6	3.0	3.2	3.5	4.0
0	10.5	12.9	13.3	15.0	17.5
3	8.16	9.00	9.46	11.4	13.6
8	4.95	6.62	7.42	8.01	8.34

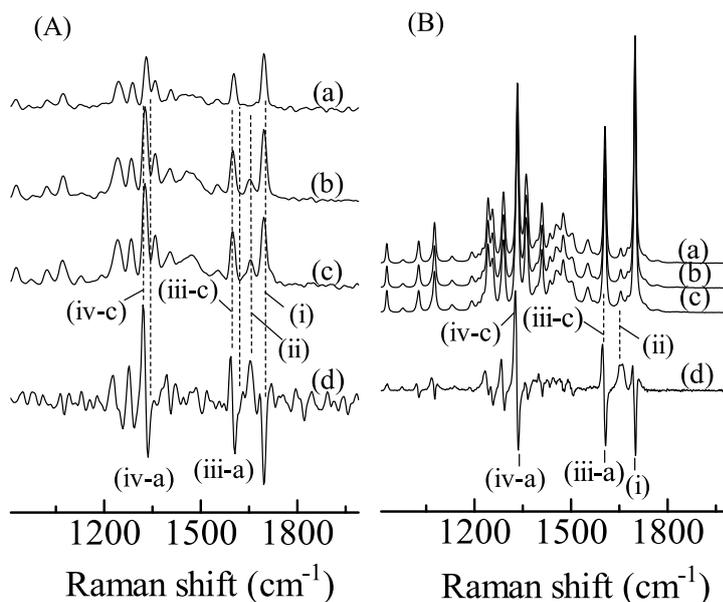


Fig.2. (A)後方散乱ラマン(BRS)と(B)透過ラマン(TRS)のラマンスペクトル : (a) 未乾燥, (b) 3 時間乾燥, (c) 8 時間乾燥, (d) (c)-(a)として得た差スペクトル

トルでは, (ii)の正のピーク及び(i)の負のピークが特徴的であることがわかった。正負のピークが対になる現象は(iii)と(iv)においても確認された。ピーク(ii)はC(4)=O(2)伸縮振動に該当する。(i)の負のピークはC(1)=O(1)伸縮振動の減少によるものであった。カフェイン分子が有する2つのC=Oはいずれも隣接するカフェイン分子との水素結合に寄与しており, 分子間相互作用を示すことが知られている³²。つまり, これらの水素結合に寄与するピークの増減は, 擬似結晶多形転移過程にカフェイン分子が再配列することに起因すると考えられる。

ピーク(iii)はC(2)=C(3)伸縮振動に起因し¹⁹, 正と負のピークが対になってスペクトルに表れている。そうした正負対のピークはラマンスペクトル中に見られるピーク位置が負から正にかけてシフトしたことを示している。

他のピーク変動としては(iv)のピークシフトが特徴的であった。このピークはプリン環を形成するCNCの変角振動に起因する。カフェイン水和物の結晶構造における水分子がプリン環の窒素に結合することでCNCから水分子が脱離する。その挙動がラマンシフトとして示されることが近年報告された¹⁴。

PLSR分析を用いて構築された錠剤中の水分含有量検量モデルをFig. 3, 4に示す。TRSおよびBRS, それぞれに基づく結果を比較すると, 相関係数と分散

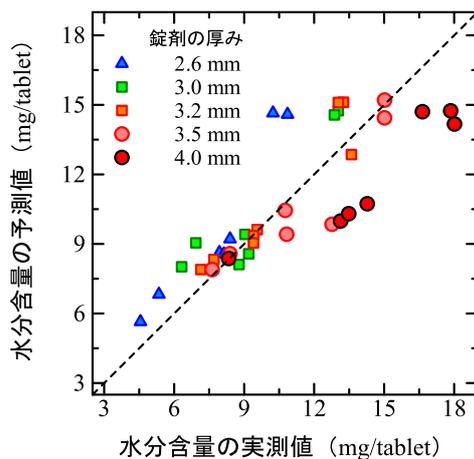


Fig.3. BRS に基づく PLSR 回帰分析によって同定された水分含量の予測値と実測値の相関

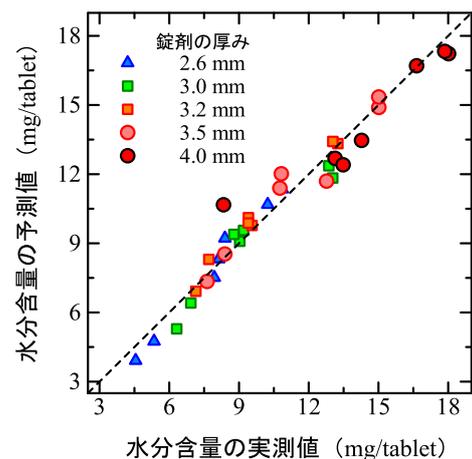


Fig.4. TRS に基づく PLSR 回帰分析によって同定された水分含量の予測値と実測値の相関

に明確な差異が見られた。BRS に基づくモデルでは、水分含有量が増加するにつれて分散が高まっており、不均一であった。水分含量の予測値は、錠剤の厚みが 2.6 mm と 3.0 mm の薄い錠剤では過大に、3.5 mm と 4.0 mm の厚い錠剤では過小に評価された。両者のキャリブレーションモデルにおける標準誤差(SE), 予測残差平方和(PRESS), 相関係数(R^2)の値を Table 2 に示す。これらの結果から、TRS モデルは BRS モデルよりも正確なモデルであることが明確となった。また、クロスバリデーションの SE 値からも TRS モデルが BRS モデルよりも正確であることが示された。さらに、TRS モデルは錠剤の厚さに関わらず均一な分散を示したことから、厚みの影響を受けないことが示唆された。以前に Ito らは、透過 NIR を用いて錠剤中の API 含量を予測するには錠剤の厚みの変化を最小限に抑えなければならないと報告している³³。これは NIR の場合、光の透過率が低く、サンプルの厚みによる影響を受け易いためである。だが、TRS は錠剤の厚みの影響を受けず、水分含有量の高精度な予測モデルを構築することが可能であった。これはラマン分光法が高出力励起レーザー光を使用していることと、NIR よりもピークが鋭く重なりが少ないことが要因であると考えられる。

キャリブレーションモデルのローディングスペクトルを Fig. 5 に示す。第一潜在変数(LV1)の寄与率は BRS モデルにおいて 77.8%であった。LV1 を示すローディングスペクトルにはいくつかの負のピークが見られた。これらのピークは Fig.

Table 2. BRS 及び TRS それぞれの PLSR 分析に基づく水分含量のキャリブレーションとクロスバリデーションモデル構築における誤差.

因子	クロスバリデーション			キャリブレーション			
	SE (mg)	PRESS (mg ²)	R ²	SE (mg)	PRESS (mg ²)	R ²	
BRS	1	2.46	218	0.476	2.36	189	0.544
	2	1.92	133	0.678	1.68	92.7	0.776
	3	2.20	174	0.592	0.843	22.7	0.945
TRS	2	0.728	19.1	0.954	0.654	14.1	0.966
	3	0.717	18.5	0.955	0.589	11.1	0.973
	4	0.816	24.0	0.942	0.387	4.64	0.988

2 (A)に示された差スペクトルにおいて正のピークとして表れている。一方で、第二潜在変数(LV2)を示すローディングスペクトルに見られた正のピークは Fig. 2 (A)における負のピークに対応している。LV1 と LV2 の合計寄与率は 85.1%であった。従って、BRS のピーク変動はカフェイン水和物と無水物間における擬似結晶多形転移を示していると考えられる。

TRS モデルにおける LV1 は寄与率 75.5%を示しており、そのローディングスペクトルにはいくつか特徴的なピークが確認された。BRS 同様、LV1 ローディングスペクトルは Fig. 2 (B)に示した差スペクトルのピークと対応していた。また、LV2 のローディングスペクトルには(i)と(v)の負のピークが確認された。

4. 考察

まず、ラマンスペクトルとカフェイン擬似結晶多形転移の関係について考察する。Fig. 6 は無水物³⁴の結晶構造を示す。CAH の結晶構造は、C(1)=O(1)と C(5)-H(1)間の水素結合と、水分子と N(4)の結合から成る。C(1)=O(1)と C(5)-H(1)間の水素結合は距離が短いために、密接な相互作用によって形成される。一方、カフェイン無水物は C(4)=O(2)と C(8)H₃ の水素結合を介して対称な二量体構造を形

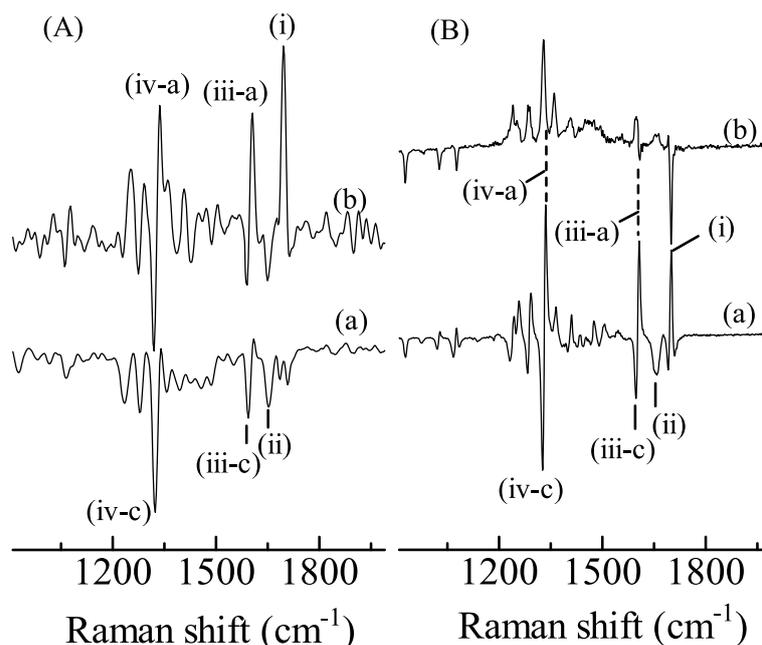


Fig.5. (A)TSR と(B)BRS のキャリブレーションモデルから得られた第一潜在変数(a)と第二潜在変数(b)のローディングスペクトル。各ピークは Fig. 1 のラマンスペクトルのピークに対応する。

成する。C=O と CH 間の水素結合は相互作用を示すことが知られており、Matasらはカフェイン無水物においてもその相互作用が見られ、それが安定性に寄与することを報告している¹⁹。また、二量体を形成する水素結合は 3.008 Å と距離が長く弱い。ここで生じる弱い相互作用がピーク(ii)に寄与していると考えられる。

次に、水和物と無水物の結晶構造を比較する。無水物においては、二量体形成だけでなく、C(1)=O(1)と C(8)H₃ 間の水素結合を介してカフェイン分子が結合している。脱水過程では水和物における C(1)=O(1)と CH の結合が解離し、C(1)=O(1)と C(8)H が水素結合することで無水物が形成される。形成された無水物に見られる C=O と CH 間の水素結合はいずれも相互作用が弱いものである。つまり、脱水の進行につれて、C(1)=O(1)を介した水素結合は相互作用の強いものから弱いものへと遷移すると言える。その結果、脱水によってラマンピーク(i)が減少したと考える。

次に、TRS に基づくキャリブレーションモデル結果について述べる。LV2 の寄与率は 18.6%であり、ローディングスペクトルには(i)の負のピークが示された。無水物の 2 つのカフェイン分子のプリン環には π - π スタッキングによる相互作用

用が生じたと考えられる。

LV1 は水分子そして C(1)=O(1)と C(5)H(1)間の水素結合の解離に伴う二量体形成過程を示した。C(1)=O(1)と C(8)H 間の水素結合の形成過程及び π - π 相互作用に参与する情報は LV2 に示された。BRS モデルの LV2 には(i)のピークが見られた。従って、錠剤中の水分含量のキャリブレーションモデルは脱水過程における結晶構造変化に基づいて構築されたと言える。

BRS に基づくモデルは Fig. 3 に示した。BRS の励起光は錠剤内部に到達しないことから、厚い錠剤中の水分含量の予測値は実測値よりも低く示され、ミスキャリブレーションが起きた。しかしながら、脱水が進行すると、予測値と実測値間の偏差が減少し、予測値が実測値に近い値となった。これは、BRS では錠剤表面付近の水分含量を錠剤全体の水分含量として示しているためである。こうした BRS の結果から、錠剤表面と中心では脱水量に差があることが示された。

一般に、水分子の振動モードはラマン不活性であることから、ラマン分光法は錠剤の水分含有量を測定することには不向きであると考えられている。しかし、本研究では、水和物から無水物への結晶構造の変化に起因する情報から、水分含量のキャリブレーションモデルを構築することに成功した。

BRS キャリブレーションモデルにおける厚い錠剤の予測結果から、錠剤の脱水は中心から表面にかけて進行することが示された。水分子はカフェイン分子中の N(4)に結合するが、その結合部位が脱水に伴って表面側に遷移することが示唆された。

実際には、水和物の結晶構造は単結晶 $P2_1/a$ の空間群(a: 14.8 Å, b: 16.7 Å, c: 3.97 Å, α : 90°, β : 97°, γ : 90°)によって構成される³⁵。カフェイン分子は結晶学的に c 軸に平行に積み重ねた構造をしている。水和水は Fig. 6 に示したように直線的な配列を成している。脱水反応過程において水分子が連鎖反応に伴って連続的に水和部位を遷移させることが考えられる。

近年、技術の発展によりサンプルの深部まで分析することが可能な手法としてラマン分光法が挙げられる。この特徴を活かすことで製剤学や医学研究の分野を含む多くの分野で有効に取り入れられると考えられる³⁶。将来的に製剤の品質管理のためには水分含有量の予測モデルの構築が有効であるが、その実現のためには水和物を含む他の添加剤を有する錠剤においても予測モデルを開発

することが必要となる。

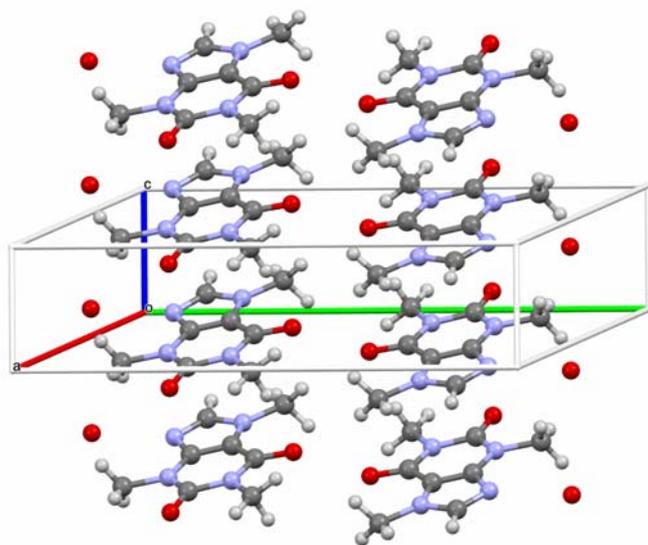


Fig.6. カフェイン無水物の結晶構造.

5. 結論

本研究では、BRS と TRS の測定結果からそれぞれに基づく錠剤の水分含有量予測 PLSR モデルを構築した。両モデルの比較から、TRS は BRS よりも予測精度が高く、より有用であることが示された。BRS の場合、情報は主に錠剤表面から収集され、水和物の減少と無水物の増加を示していた。一方で、TRS は錠剤全体の情報を収集することが可能であった。さらに、キャリブレーションモデルは無水物と水和物間の擬似結晶多形転移に基づいて構築された。

結論として、水への溶解度が低く生物学的利用能の低い CAH を溶解度の高い無水物結晶への転移させる加熱脱水過程のモニタリング手法として TRS は、極めて正確な分析手法として有効であることが示された。これらの手法を医薬品製造工程に適用することにより、生物学的利用能などの品質が高い、有効で安心安全な高齢者や小児用にやさしい医薬品を迅速で安価に提供できる技術が発展するものと考えられる。

謝辞

本研究において技術支援を賜りましたジャパンマシナリー株式会社中村和也氏

に感謝申し上げます。また、本研究の一部は2017年度しあわせ研究費（研究テーマ：子供や高齢者に優しい医薬品剤形の開発）の助成を受けたものです。

References

1. Debnath S, Suryanarayanan R. Influence of processing-induced phase transformations on the dissolution of theophylline tablets. *AAPS PharmSciTech*. 2004;5(1):39. doi:10.1208/pt050108
2. Shefter E, Higuchi T. Dissolution behavior of crystalline solvated and nonsolvated forms of some pharmaceuticals. *J Pharm Sci*. 1963;52(8):781-791. doi:10.1002/jps.2600520815
3. Zografi G. States of Water Associated with Solids. *Drug Dev Ind Pharm*. 1988;14(14):1905-1926. doi:10.3109/03639048809151997
4. Halebian J, McCrone W. Pharmaceutical applications of polymorphism. *J Pharm Sci*. 1969;58(8):911-929. doi:10.1002/jps.2600580802
5. Otsuka M, Hasegawa H, Matsuda Y. Effect of Polymorphic Transformation During the Extrusion-Granulation Process on the Pharmaceutical Properties of Carbamazepine Granules. *Chem Pharm Bull (Tokyo)*. 1997;45(5):894-898. doi:10.1248/cpb.45.894
6. Sakata Y, Shiraishi S, Otsuka M. Effect of pulverization of the bulk powder on the hydration of creatine anhydrate tablets and their pharmaceutical properties. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2005;46(2):92-100. doi:10.1016/j.colsurfb.2005.10.002
7. Nikolaou A, Meric S, Fatta D. Occurrence patterns of pharmaceuticals in water and wastewater environments. *Anal Bioanal Chem*. 2007;387(4):1225-1234. doi:10.1007/s00216-006-1035-8
8. Bielen A, Šimatović A, Kosić-Vukšić J, et al. Negative environmental impacts of antibiotic-contaminated effluents from pharmaceutical industries. *Water Res*. 2017;126:79-87. doi:10.1016/j.watres.2017.09.019
9. Peeters E, Tavares da Silva AF, Toiviainen M, et al. Assessment and prediction of tablet properties using transmission and backscattering Raman spectroscopy and transmission NIR spectroscopy. *Asian J Pharm Sci*. 2016;11(4):547-558. doi:10.1016/j.ajps.2016.04.004

10. Fonteyne M, Vercruysse J, Díaz DC, et al. Real-time assessment of critical quality attributes of a continuous granulation process. *Pharm Dev Technol.* 2013;18(1):85-97. doi:10.3109/10837450.2011.627869
11. Hinz DC. Process analytical technologies in the pharmaceutical industry: the FDA's PAT initiative. *Anal Bioanal Chem.* 2006;384(5):1036-1042. doi:10.1007/s00216-005-3394-y
12. Eliasson C, Macleod NA, Jayes LC, et al. Non-invasive quantitative assessment of the content of pharmaceutical capsules using transmission Raman spectroscopy. *J Pharm Biomed Anal.* 2008;47(2):221-229. doi:10.1016/j.jpba.2008.01.013
13. Otsuka M, Kanai Y, Hattori Y. Real-Time Monitoring of Changes of Adsorbed and Crystalline Water Contents in Tablet Formulation Powder Containing Theophylline Anhydrate at Various Temperatures During Agitated Granulation by Near-Infrared Spectroscopy. *J Pharm Sci.* 2014;103(9):2924-2936. doi:10.1002/jps.24006
14. Hédoux A, Paccou L, Derollez P, Guinet Y. Dehydration mechanism of caffeine hydrate and structural description of driven metastable anhydrates analyzed by micro Raman spectroscopy. *Int J Pharm.* 2015;486(1-2):331-338. doi:10.1016/j.ijpharm.2015.04.001
15. Johansson J, Sparén A, Svensson O, Folestad S, Claybourn M. Quantitative Transmission Raman Spectroscopy of Pharmaceutical Tablets and Capsules. *Appl Spectrosc.* 2007;61(11):1211-1218.
16. Matousek P, Parker AW. Bulk Raman Analysis of Pharmaceutical Tablets. *Appl Spectrosc.* 2006;60(12):1353-1357. doi:10.1366/000370206779321463
17. Morris KR, Griesser UJ, Eckhardt CJ, Stowell JG. Theoretical approaches to physical transformations of active pharmaceutical ingredients during manufacturing processes. *Adv Drug Deliv Rev.* 2001;48(1):91-114. doi:10.1016/S0169-409X(01)00100-4
18. Otsuka M, Ibe K, Tokudome Y, Ohshima H. Nano- and macro-geometrical structural change of caffeine and theophylline anhydrate tablets during hydration process by using X-ray computed tomography. *Colloids Surf B Biointerfaces.* 2009;73(2):351-359. doi:10.1016/j.colsurfb.2009.06.002
19. de Matas M, Edwards HGM, Lawson EE, Shields L, York P. FT-Raman

- spectroscopic investigation of a pseudopolymorphic transition in caffeine hydrate. *J Mol Struct.* 1998;440(1-3):97-104. doi:10.1016/S0022-2860(97)00231-7
20. Krzyzaniak JF, Williams GR, Ni N. Identification of phase boundaries in anhydrate/hydrate systems. *J Pharm Sci.* 2007;96(5):1270-1281. doi:10.1002/jps.20941
21. Jørgensen A, Rantanen J, Karjalainen M, Khriachtchev L, Räsänen E, Yliruusi J. Hydrate Formation During Wet Granulation Studied by Spectroscopic Methods and Multivariate Analysis. *Pharm Res.* 2002;19(9):1285-1291. doi:10.1023/A:1020621906855
22. Uchida H, Otsuka M. Quantitative analysis of pseudopolymorphic transformation of imidafenacin by application of a novel combination of near-infrared spectroscopy and a humidity-controlled 96-well plate. *J Pharm Pharmacol.* 2011;63(7):911-917. doi:10.1111/j.2042-7158.2011.01297.x
23. Bagheri L, Madadlou A, Yarmand M, Mousavi ME. Spray-dried alginate microparticles carrying caffeine-loaded and potentially bioactive nanoparticles. *Food Res Int.* 2014;62:1113-1119. doi:10.1016/j.foodres.2014.05.040
24. Gottfries J, Depui H, Fransson M, et al. Vibrational spectrometry for the assessment of active substance in metoprolol tablets: a comparison between transmission and diffuse reflectance near-infrared spectrometry. *J Pharm Biomed Anal.* 1996;14(11):1495-1503. doi:10.1016/0731-7085(96)01800-6
25. Hargreaves MD, Macleod NA, Smith MR, Andrews D, Hammond SV, Matousek P. Characterisation of transmission Raman spectroscopy for rapid quantitative analysis of intact multi-component pharmaceutical capsules. *J Pharm Biomed Anal.* 2011;54(3):463-468. doi:10.1016/j.jpba.2010.09.015
26. Zhang Y, McGeorge G. Quantitative Analysis of Pharmaceutical Bilayer Tablets Using Transmission Raman Spectroscopy. *J Pharm Innov.* 2015;10(3):269-280. doi:10.1007/s12247-015-9223-8
27. Otsuka M, Tanabe H, Osaki K, Otsuka K, Ozaki Y. Chemoinformetrical Evaluation of Dissolution Property of Indomethacin Tablets by Near-Infrared Spectroscopy. *J Pharm Sci.* 2007;96(4):788-801. doi:10.1002/jps.20704
28. Alcalà M, León J, Ropero J, Blanco M, Romañach RJ. Analysis of low content drug

- tablets by transmission near infrared spectroscopy: Selection of calibration ranges according to multivariate detection and quantitation limits of PLS models. *J Pharm Sci.* 2008;97(12):5318-5327. doi:10.1002/jps.21373
29. Meza CP, Santos MA, Romañach RJ. Quantitation of drug content in a low dosage formulation by transmission near infrared spectroscopy. *AAPS PharmSciTech.* 2006;7(1):E206-E214. doi:10.1208/pt070129
30. Griffen JA, Owen AW, Burley J, Taresco V, Matousek P. Rapid quantification of low level polymorph content in a solid dose form using transmission Raman spectroscopy. *J Pharm Biomed Anal.* 2016;128:35-45. doi:10.1016/j.jpba.2016.05.017
31. Matousek P, Parker AW. Bulk Raman Analysis of Pharmaceutical Tablets. *Appl Spectrosc.* 2006;60(12):1353-1357. doi:10.1366/000370206779321463
32. Edwards HGM, Lawson E, Matas M de, Shields L, York P. Metamorphosis of caffeine hydrate and anhydrous caffeine. *J Chem Soc Perkin Trans 2.* 1997;0(10):1985-1990. doi:10.1039/A702041D
33. Ito M, Suzuki T, Yada S, et al. Development of a method for nondestructive NIR transmittance spectroscopic analysis of acetaminophen and caffeine anhydrate in intact bilayer tablets. *J Pharm Biomed Anal.* 2010;53(3):396-402. doi:10.1016/j.jpba.2010.04.029
34. Enright GD, Terskikh VV, Brouwer DH, Ripmeester JA. The Structure of Two Anhydrous Polymorphs of Caffeine from Single-Crystal Diffraction and Ultrahigh-Field Solid-State ¹³C NMR Spectroscopy. *Cryst Growth Des.* 2007;7(8):1406-1410. doi:10.1021/cg070291o
35. Sutor DJ. The structures of the pyrimidines and purines. VII. The crystal structure of caffeine. *Acta Crystallogr.* 1958;11(7):453-458. doi:10.1107/S0365110X58001286
36. Buckley K, Matousek P. Recent advances in the application of transmission Raman spectroscopy to pharmaceutical analysis. *J Pharm Biomed Anal.* 2011;55(4):645-652. doi:10.1016/j.jpba.2010.10.029