



Edyta Leyk

**Ocena użyteczności różnicowej kalorymetrii
skaningowej w analizie wybranych substancji
czynnych w produktach leczniczych**

Promotor rozprawy: **prof. dr hab. Marek Wesółowski**

Praca wykonana w Katedrze i Zakładzie Chemii Analitycznej Gdańskiego
Uniwersytetu Medycznego

Gdańsk 2018

STRESZCZENIE

Różnicowa kalorymetria skaningowa (*Differential Scanning Calorimetry* - DSC) jest uznaną metodą analizy fazowej, znajdującą wielokierunkowe zastosowanie w badaniu substancji przeznaczonych do celów farmaceutycznych, szczególnie tych występujących w stanie stałym. Użyteczność DSC, zarówno w badaniach naukowych jak i w technologii postaci leku, sprowadza się głównie do badania procesów krystalizacji i amorfizacji substancji czynnych, polimorfizmu i wpływu procesów technologicznych na przemiany polimorficzne, oceny czystości oraz zgodności pomiędzy substancjami czynnymi i pomocniczymi. Ponadto, DSC jest jedną z podstawowych metod badania eutektyków, kompleksów inkluzyjnych, ko-kryształów oraz stałych dyspersji, poprawiających biodostępność trudno rozpuszczalnych substancji leczniczych. Jak dotychczas, w piśmiennictwie znajduje się niewiele doniesień wskazujących na możliwość użycia DSC w kontroli składu preparatów farmaceutycznych. W związku z tym, podstawowym celem badań była kompleksowa ocena, w jakim zakresie technika DSC może być przydatna do analizy ilościowej substancji czynnych w handlowych preparatach farmaceutycznych. Zasadność podjęcia tego tematu uzasadnia dodatkowo fakt, że DSC spełnia większość założeń tzw. zielonej chemii, w szczególności dotyczących ograniczenia zużycia odczynników chemicznych oraz ich utylizacji.

Realizując cel pracy, przygotowano szereg mieszanin wzorcowych badanych substancji czynnych – paracetamolu, kwasu acetylosalicylowego, kofeiny i teofiliny z tlenkiem glinu oraz substancjami pomocniczymi najczęściej stosowanymi w technologii stałych postaci leku, tj. z hypromelozą, laktozą, sacharozą i skrobią, a ponadto z mieszaninami hypromelozy lub laktozy ze stearynianem magnezu. Badania DSC tych mieszanin wykazały, że endotermiczny pik DSC związany z topnieniem substancji czynnej w temperaturze zgodnej z danymi literaturowymi, był widoczny na krzywych większości mieszanin. Jednak w przypadku niektórych mieszanin zawierających substancje czynne w ilości poniżej 5-50%, nie obserwowano efektu związanego z topnieniem. Pomijając te mieszaniny, dla pozostałych o wyższej zawartości substancji czynnej, zdołano wykreślić krzywe kalibracji na podstawie liniowej zależności entalpi topnienia od zawartości substancji czynnych w mieszaninie. Uzyskane krzywe były jednak przesunięte względem początku układu współrzędnych, wskazując na błąd systematyczny metody. Jako możliwą przyczynę

tego błędu dane literaturowe wskazują utratę krystaliczności przez część substancji leczniczej spowodowaną kontaktem z substancją pomocniczą, szczególnie z hypromelozą. W celu wykluczenia wpływu homogenizacji mieszanin na stopień krystaliczności substancji czynnych, mieszaniny z hypromelożą delikatnie mieszano kartą celuloidową. Efektem było mniejsze przesunięcie krzywej kalibracji, jednak nie zniwelowano go całkowicie. Próba wykorzystania krzywych kalibracji do oznaczeń substancji czynnych w preparatach farmaceutycznych nie powiodła się, uzyskane dane w większości przypadków nie pokrywały się zawartością analitów deklarowaną przez producentów. Również zastosowanie metody dodatku wzorca celem wykluczenia wpływu matrycy na wynik oznaczenia, nie dostarczyło zadowalających wyników.

Próbując wyjaśnić charakter oddziaływań pomiędzy substancjami czynnymi i pomocniczymi, zastosowano spektroskopię FTIR i Ramana. Pomimo, że badane substancje lecznicze odznaczają się zdolnością do tworzenia wiązań wodorowych z hypromelożą, na podstawie widm FTIR i Ramana wykluczono obecność wiązań wodorowych i niezgodność chemiczną pomiędzy substancjami. Potwierdzono jedynie częściową deacetylację kwasu acetylosalicylowego.

W kolejnym etapie badań zastosowano termomikroskopię w celu wykrycia zmian w wyglądzie kryształów substancji leczniczych i ziaren bezpostaciowej hypromelozy. Badania nie potwierdziły jednak faktu tworzenia się w podwyższonej temperaturze nowych kryształów lub cząstek amorficznych substancji czynnych, których wygląd byłby inny niż substancji wyjściowych. Stwierdzono natomiast sublimację paracetamolu, kofeiny i teofiliny oraz potwierdzono deacetylację kwasu acetylosalicylowego.

Kontynuując badania postanowiono zweryfikować dane literaturowe wskazujące na możliwość utraty krystaliczności, a ponadto na rozpuszczalność i mieszalność substancji czynnych z substancjami pomocniczymi o charakterze polimeru. Mieszalność składników interpretuje się jako zdolność do tworzenia trwałej dyspersji, która różni się właściwościami fizycznymi od właściwości jej składników. Ilościowy opis powyższych zjawisk jest możliwy w oparciu o diagram fazowy, opracowany dla mieszaniny krystalicznej substancji czynnej i bezpostaciowego polimeru. Klasyczny diagram fazowy konstruuje się w oparciu o temperatury topnienia dwóch składników krystalicznych. Będąca polimerem hypromeloza nie topi się, natomiast charakteryzuje ją przemiana szklista. Diagram fazowy dla tego typu mieszaniny składa się z krzywych ilustrujących rozpuszczalność i wzajemną mieszalność składników. Ponadto, jeżeli substancja czynna występuje w formie amorficznej, diagram zawiera krzywą prognozującą przemianę szklistą mieszaniny. Spośród badanych substancji

czynnych, jedynie dla formy amorficznej paracetamolu dostępne są w piśmiennictwie dane umożliwiające wyznaczenie tej krzywej.

W związku z powyższym, opracowano diagramy fazowe dla dwuskładnikowych mieszanin fizycznych paracetamolu, kwasu acetylosalicylowego, kofeiny i teofiliny z hypromelozą. Przedstawiają one prognozowany na podstawie obliczeń stan równowagi w mieszaninie, w zależności od składu i temperatury mieszaniny. Do obliczeń warunkujących wyznaczenie krzywej rozpuszczalności, wykorzystuje się współczynnik aktywności uzyskany na podstawie parametrów rozpuszczalności Hansena, które charakteryzują międzycząsteczkowe oddziaływania polarne, oddziaływania związane z dyspersją cząstek oraz oddziaływania wynikające z tworzenia wiązań wodorowych. Krzywa mieszalności przedstawia natomiast wartość temperatury, w której składniki mieszaniny o określonym składzie będą tworzyły trwałą dyspersję o dobrej mieszalności. Opracowanie tej krzywej opiera się na wykorzystaniu teorii Florry-Huggins'a i energii swobodnej Gibbsa dla mieszaniny dwuskładnikowej. Krzywa mieszalności substancji czynnej z polimerem obrazuje układ faz, w którym różnica energii swobodnej w mieszaninie jest równa zero, przez co układ jest energetycznie trwały. W takim układzie cząstki poszczególnych składników nie wykazują tendencji do agregacji.

Badania DSC, w których próbki poddawano kolejnym cyklom – ogrzewania, następnie szybkiego chłodzenia, po czym ponownego ogrzewania, umożliwiły porównanie temperatury prognozowanej przemiany szklistej mieszaniny z rzeczywistą temperaturą jej zeszklenia. Badania paracetamolu i jego mieszanin z hypromelozą wykazały, że w trakcie pierwszego ogrzewania, występujący w formie I paracetamol stopił się. W trakcie szybkiego chłodzenia tworzy się forma amorficzna, która w kolejnym, drugim cyklu ogrzewania, uległa przemianie szklistej, a następnie rekrytalizacji do formy II paracetamolu i stopieniu tej formy. Badania wykazały, że wspólne stopienie substancji czynnej z polimerem doprowadziło do zatrzymania krystalizacji paracetamolu.

Odniesienie wyników obliczeń rozpuszczalności i wzajemnej mieszalności składników do rzeczywistych warunków panujących w mieszaninie wymagałoby danych dotyczących m.in. temperatury osiągniętej w trakcie homogenizacji mieszanin wzorcowych. W przypadku preparatów farmaceutycznych, należałoby uwzględnić temperaturę występującą w trakcie procesów technologicznych oraz wpływ wszystkich użytych substancji pomocniczych na krystaliczność substancji czynnej.

W podsumowaniu można stwierdzić, że rozpuszczalność substancji czynnej w polimerze oraz wzajemna mieszalność składników wyjaśniają przyczynę niepowodzenia w

wykorzystaniu DSC do badań ilościowych. Oba procesy są bowiem powodem utraty krystaliczności przez część substancji czynnej w wyniku jej kontaktu z bezpostaciowym polimerem.

SUMMARY

Differential Scanning Calorimetry - DSC is a recognized method of phase analysis, which finds multidimensional application in studying substances used in pharmacy, especially those appearing in solid state. Usefulness of DSC in the field of scientific research, as well as in pharmaceutical technology, is important for studies of crystallization and amorphisation of active substances, polymorphism and impact of technological processes on phase transitions, also for evaluation of purity and compatibility of active pharmaceutical ingredients with excipients. Moreover, DSC is one of basic methods for studies of eutectics, inclusion complexes, co-crystals and solid dispersions, which enhance bioavailability of poorly water soluble drug substances. As for now, there is a limited number of reports in the literature showing the possibility of using DSC technique for composition control of pharmaceutical preparations. Due to this, the main aim of the studies was to evaluate usefulness of DSC as a technique for quantitative analysis of active substances in pharmaceutical preparations. The reason for undertaking these studies can also be justified by the fact that DSC meets the majority of criteria of “green chemistry”, especially those concerning limitation of use of chemical reagents and their utilization.

Realizing the aim of studies, a set of standard mixtures of investigated active substances were prepared – paracetamol, acetylsalicylic acid, caffeine, and theophylline with aluminium oxide and excipients frequently used in solid drugs technology, including hypromellose, lactose, saccharose, starch and also with mixtures of hypromellose or lactose with magnesium stearate. The DSC studies of these mixtures have shown that endothermic DSC peak connected to melting of an active substance in a temperature, as reported in literature, was visible in most of curves of investigated mixtures. However, in the case of several mixtures containing active substances in amounts of 5-50%, no effect caused by melting was noticed. Not counting these mixtures, for the other mixtures with higher concentration of an active substance, calibration curves were determined based on linear relation of enthalpy of melting to the level of active substances in a mixture. It must be stressed that obtained curves were shifted along ordinate axis, indicating in this way the

systematic error of the method. As a possible reason for this shift the literature data point on the decrease of the crystallinity by some part of a drug substance, which can be caused by a contact with excipient, especially with hypromellose.

In order to exclude the impact of homogenization of mixtures on the degree of crystallization of active substances, the mixtures of hypromellose were gently mixed with plastic spatula. The effect was a smaller shift of a calibration curve, but it was not eliminated completely. The attempt to use the calibration curves for quantitation of active substances in pharmaceutical preparations was not successful, and the obtained data in the most cases were not concurrent with the concentration of analytes declared by manufacturers. The application of a multiple standard addition in order to exclude the impact of a matrix, was not a success, either.

Trying to explain the nature of interrelations between active substances and excipients, FTIR spectroscopy and Raman spectroscopy were applied. In spite of a fact that studied drug substances can create hydrogen bonding with hypromellose, based on FTIR and Raman spectra, it was excluded that hydrogen bonding was present, as well as chemical incompatibility. Hence, only partly deacetylation of acetylsalicylic acid was confirmed.

In the next step of the investigation, thermomicroscopy was applied in order to detect changes in the appearance of crystals of drug substances and grains of amorphous hypromellose. However, the performed studies didn't confirm the creation of new crystals or amorphous particles in higher temperature, which structure could differ than primary substances. On the other hand, sublimation of paracetamol, caffeine and theophylline was noticed, as well as deacetylation of acetylsalicylic acid.

Continuing the studies, it was decided to verify literature data indicating the possibility to loose crystallinity, also solubility and miscibility of active substances with excipients, which are polymers. Miscibility of constituents can be interpreted as ability to create stable dispersion, which differs with its physical properties in comparison with its other constituents. Quantitative description of the above mentioned phenomena is possible based on phase diagram developed for the mixture of crystal active substance with amorphous polymer. The classical phase diagram can be constructed basing on melting temperatures of two crystal components. Hypromellose, which is a polymer, doesn't melt, but is characterized by a glass transition. Phase diagram for such type of mixture consists of the curves illustrating solubility and inter-miscibility of the constituents. Moreover, when an active substance appears in an amorphous form, its diagram contains the curve predicting glass transition of a mixture. Among investigated active substances, only for the amorphous form of paracetamol, it is

possible to find in literature the data, which enable the designation of the curve.

Taking above into consideration, the phase diagrams were developed for binary physical mixtures of paracetamol, acetylsalicylic acid, caffeine and theophylline with hypromellose. They present the phase equilibrium of the mixture predicted on the basis of calculation, depending on the composition and temperature of a mixture. For a calculation, which determine the designation of a solubility curve, the activity coefficient is used, obtained based on Hansen solubility parameters, which characterize intermolecular polar interactions, also dispersion forces and interactions connected to hydrogen bonding. The miscibility curve shows the value of temperature, in which the constituents of a mixture with certain composition will create stable dispersion with a good miscibility. The development of this curve is based on the use of the Florry-Huggins' theory and the Gibbs free energy for a binary mixture. The miscibility curve of an active substance with a polymer is illustrated by a phase system, in which the difference in Gibbs free energy in a mixture is equal to zero, and due to this the system is energetically stable. In such a system the particles of particular constituents do not show the tendency to aggregate.

DSC studies, in which the samples were treated by consecutive cycles – heating, rapid cooling, and then second heating, enabled comparison of the predicted temperature of glass transition of a mixture with real temperature of its glass transition. The studies on paracetamol and its mixtures with hypromellose have shown that during first heating, the paracetamol occurring in a form I melted. Under rapid cooling an amorphous form was created, and in the second heating stage it is transformed by glass transition, and finally it is recrystallized to form II of paracetamol and melted. The studies have also shown that melting together the active substance with the polymer leads to stopping of paracetamol's crystallization.

Relation of the results of solubility and miscibility of constituents to the real conditions appearing in a mixture would require the particular data, for example the temperature achieved during homogenization of standard mixtures. In the case of pharmaceutical preparations, it should be taken into consideration the temperature occurring during technological processes, as well as the impact of all used excipients on the crystallinity of an active substance.

In a summary it can be stated that the solubility of an active substance in a polymer and miscibility of constituents, explain the reason for failure in application of DSC for quantitative studies. Both processes can cause the loss of crystallinity by some part of an active substance as a result of its contact with an amorphous polymer.