

**Gdański Uniwersytet Medyczny**  
**Wydział Farmaceutyczny z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej**

**Piotr Szykaruk**

**Analiza termiczna wybranych metyloksantyn  
i soli magnezu stosowanych w lecznictwie**

**Praca doktorska wykonana  
w Katedrze i Zakładzie Chemii Analitycznej  
Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego**

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

**Gdańsk, 2019**

## STRESZCZENIE

W ostatnich latach metody analizy termicznej znajdują coraz szersze zastosowanie w farmacji, zarówno w badaniach naukowych jak i w przemyśle farmaceutycznym. Powstaje nowa aparatura do badań termoanalitycznych o zwiększonej czułości i szybkości pomiaru, a przemysł farmaceutyczny wdraża nowe standardy celem spełnienia wysokich norm jakości dążąc do zapewnienia bezpieczeństwa terapii. Obserwowane ostatnio tendencje zmiernają także w kierunku monitorowania procesu produkcji w czasie rzeczywistym, co eliminuje konieczność kontroli jakości produktu końcowego. Wdrażanie nowego podejścia do problemu jakości w branży farmaceutycznej wymaga m.in. opracowania nowych procedur analitycznych zdolnych do sprostania tym potrzebom. Biorąc powyższe pod uwagę, celem pracy było ustalenie, w jakim stopniu wybrane techniki analizy termicznej: DSC, DTA, TG i DTG oraz spektroskopii w podczerwieni: FT-IR i Ramana, mogą być przydatne do identyfikacji aktywnych składników farmaceutycznych w zawierających je produktach farmaceutycznych i suplementach diety, na podstawie badań rozkładu termicznego w stanie stałym i w oparciu o analizę współczynników podobieństwa widm spektroskopowych.

W pracy wykorzystano stosowane szeroko w lecznictwie pochodne puryny i związki magnezu. Spośród pochodnych puryny (metyloksantyn) badano teofilinę, teobrominę, kofeinę, diprofilinę i aminofilinę. Spośród związków magnezu badano sole kwasów organicznych i nieorganicznych: tetrahydrat octanu magnezu, hydrat walproinianu magnezu, hydrat mleczanu magnezu, cytrynian magnezu i tetrahydrat wodorooasparaginianu magnezu oraz węglan, chlorek, wodorotlenek i tlenek magnezu, a ponadto wodorooasparaginian cynku. Badaniom poddano również dostępne bez recepty preparaty farmaceutyczne i suplementy diety (łącznie 57 produktów), zawierających wyżej wymienione pochodne puryny i związki magnezu. Z technik analizy instrumentalnej wykorzystano metody analizy termicznej (DSC, DTA, TG i DTG) oraz spektroskopowe (FT-IR i Ramana), ponieważ umożliwiają szybką analizę próbek o kilkumiligramowej masie, eliminując również czasochłonny proces wydzielania analitu ze złożonych matryc. Zalety tych technik mają zasadnicze znaczenie z punktu widzenia kontroli jakości w przemyśle farmaceutycznym.

Realizując cel badań sprawdzono możliwość zastosowania wybranych technik do potwierdzenia obecności substancji leczniczej w produkcie farmaceutycznym zawierającym tę substancję i kilka (lub kilkanaście) substancji pomocniczych. Badania zostały poszerzone o analizę produktów farmaceutycznych wytwarzanych przez różne firmy, ale zawierających tę samą substancję czynną w różnych ilościach. W ten sposób możliwe było oszacowanie wpływu

substancji pomocniczych, ich rodzaju i ilości, na możliwość potwierdzenia obecności substancji czynnej w produkcie farmaceutycznym, a także określenie, w jakim stopniu wybrane techniki analizy termicznej i spektroskopowe mogą być przydatne do oceny składu dostępnych w obrocie farmaceutycznym produktów i suplementów diety.

Wyniki badań termoanalitycznych wykazały, że rozkład termiczny metyloksantyn jest podobny. Z wyjątkiem aminofiliny, pozostałe związki nie zawierają wody krystalizacyjnej. Teofilina, teobromina i kofeina podczas topnienia ulegają rozkładowi, zaś diprofilina po stopieniu jest stosunkowo trwała i odparowuje dopiero w wyższych temperaturach. Rozkład termiczny kofeiny i diprofiliny można opisać jako proces trój etapowy, a teofiliny, teobrominy i aminofiliny jako dwuetapowy. W etapie pierwszym nie zachodzą żadne procesy związane ze zmianą struktury chemicznej badanego związku, co uwidacznia się na krzywych TG i DTG brakiem ubytku masy. Występujące w tym etapie wysokie, wąskie i ostro zakończone piki na krzywych DTA lub DSC odzwierciedlają przemiany fazowe, np. topnienie lub przemiany polimorficzne. Ubytek masy w tym etapie związany jest jedynie z dehydratacją aminofiliny. W etapie drugim następuje destrukcja termiczna badanych związków z utworzeniem pośrednich produktów rozkładu, której towarzyszy ponad 90% ubytek masy. Zwęglona pozostałość po tym etapie spala się w trzecim etapie rozkładu.

Analiza krzywych DTA, TG i DTG soli magnezu kwasów organicznych wskazuje, że rozkład termiczny większości badanych związków następuje w dwóch etapach. W pierwszym etapie, obejmującym zakres temperatur od 35 do 225°C następuje dehydratacja. Potwierdza to ubytek masy na krzywych TG i DTG dla czterech soli magnezu: octanu, walproinianu, mleczanu i wodorooasparaginianu. Piki na krzywych DTA także potwierdzają dehydratację. Bezwodne związki ulegają całkowitej destrukcji termicznej w drugim etapie z utworzeniem tlenku magnezu (tlenku cynku w przypadku wodorooasparaginianu cynku) jako końcowego produktu rozkładu. Z kolei nieorganiczne związki magnezu – tlenek, wodorotlenek i węglan nie podlegają żadnej transformacji termicznej w badanym zakresie temperatur. Wyjątkiem jest chlorek magnezu, który ulega dehydratacji.

Do interpretacji wyników uzyskanych na podstawie rozkładu termicznego pochodnych puryny i związków magnezu zastosowano analizę głównych składowych (PCA). Obliczenia PCA wykonane na podstawie danych otrzymanych z krzywych DTA, TG i DTG rozkładu badanych substancji wykazały, że dwie pierwsze główne składowe (PC1 i PC2) wyjaśniają łącznie ponad 80% zmienności a wartości własne PC1 i PC2 są większe niż 2. W związku z tym relacje między masą próbki a szybkością ogrzewania badano dla każdego związku w układzie dwuwymiarowym PC1 i PC2. Wskazały one, że na rozkład termiczny badanych substancji

wpływa przede wszystkim szybkość ogrzewania. Badając wpływ masy próbki przy stałej szybkości ogrzewania ustalono, że masa próbki przy szybkości ogrzewania 3°C/min wpływa na wyniki rozkładu w mniejszym stopniu, niż przy szybkości wynoszącej 15°C/min. Z tych badań wynika więc, że szybkość ogrzewania wpływa na rozkład termiczny w większym stopniu niż masa próbki, a optymalne warunki do prowadzenia badań nad rozkładem termicznym substancji organicznych to ogrzewanie 100 mg próbek z szybkością wzrostu temperatury w zakresie od 5 do 10°C/min. Obliczenia PCA wykazały również, że sole magnezu kwasów organicznych o podobnej strukturze chemicznej znajdują się na wykresie PCA w zbliżonych zakresach wartości PC1 i PC2, co dowodzi, iż ich rozkład termiczny odzwierciedla podobieństwo w strukturze chemicznej.

Wyniki badań termicznych dużej grupy preparatów farmaceutycznych i suplementów diety wykazały, że wysokie, wąskie i ostro zakończone endotermiczne piki DSC związane z przemianami fazowymi, głównie topnieniem i parowaniem badanych substancji, mogą zostać wykorzystane do identyfikacji tych substancji w analizowanych produktach. Na możliwość identyfikacji składnika duży wpływ wywiera jego zawartość w przeliczeniu na jednostkę masy drażetki, tabletki lub kapsułki. W przypadku preparatów zawierających sole magnezu stwierdzono, że do wykrycia tych związków w badanych próbkach można posłużyć się endotermicznymi pikami DSC związanymi z dehydratacją.

Bezpośrednia analiza widm FT-IR i Ramana nie zapewnia wiarygodnej identyfikacji składników w badanych produktach, zwłaszcza, że część substancji to związki nieorganiczne nie dające charakterystycznych pasm w widmach. Znacznie korzystniejsze wyniki uzyskano stosując tzw. współczynnik dopasowania. Najwyższe wartości tego współczynnika uzyskano dla widm FT-IR teofiliny, w zakresie 89,6–99,01%, co oznacza, że widma preparatów z teofiliną niemal pokrywają się z widmem teofiliny.

Podsumowując, badania z udziałem wybranych pochodnych puryny i soli magnezu wykazały, że w większości przypadków techniki DSC, FT-IR i spektroskopii Ramana mogą być użyteczne podczas wykrywania aktywnego składnika w produktach farmaceutycznych i suplementach diety. Pomiaru tymi technikami są proste i nie wymagają dużego nakładu pracy w związku z przygotowaniem próbki do badań. Duży wpływ na zdolność do wykrywania głównych składników ma zawartość tych substancji w badanych produktach. Wyniki uzyskane przy pomocy technik spektroskopowych są komplementarne w stosunku do wyników otrzymanych techniką DSC, przy czym spektroskopia FT-IR była bardziej użyteczna w realizacji celu badań niż spektroskopia Ramana.

## ABSTRACT

In last years the methods of thermal analysis have found wide application in pharmacy, both in scientific investigations, and in pharmaceutical industry. New instrumentation was created dedicated to thermoanalytical studies with enhanced sensitivity and measurement rate, and pharmaceutical industry introduces new standards in order to meet high quality norms for ensuring the safety of therapy. The newest tendencies lead to monitoring of production process in a real time, which eliminates the necessity to control the quality of a final product. Introduction of a new attitude to the quality problem in the pharmaceutical industry requires among others development of new analytical procedures able to fulfill these needs. Thus, taking above into consideration, the aim of the work was to establish in which degree the selected techniques of thermal analysis: DSC, DTA, TG and DTG, as well as infrared spectroscopic techniques, such as FT-IR and Raman spectroscopy, can be useful for identification of active ingredients in containing them pharmaceutical products and dietary supplements. These studies were based on investigations of thermal degradation in a solid state, and by the use of analysis of similarity coefficients in spectroscopic spectra.

In the work widely used in medicine purine derivatives and magnesium salts were studied. Among purine derivatives (methylxanthines) the following compounds were investigated: theophylline, theobromine, caffeine, diprophylline and aminophylline. Magnesium salts under studies were organic and inorganic: Mg acetate tetrahydrate, Mg valproate hydrate, Mg lactate hydrate, Mg citrate, Mg hydrogen aspartate tetrahydrate, as well as Mg carbonate, chloride, hydroxide and oxide, together with Zn hydrogen aspartate. There were also under investigation the OTC pharmaceutical preparations and dietary supplements (altogether 57 products) containing listed above purine derivatives and Mg salts. From instrumental techniques in the studies were used thermal methods of analysis (DSC, DTA, TG and DTG), as well as spectroscopic (FT-IR and Raman), since they are able to do fast analysis of samples with several milligram mass and to eliminate time-consuming process of extracting the analyte from complex matrices. Moreover, the advantages of these techniques have crucial significance from the point of view of quality assessment in the pharmaceutical industry.

Realizing this aim of studies it was checked the possibility to apply selected techniques for confirmation of presence of a drug substance in a pharmaceutical product containing this substance and several or more excipients. The investigations were enlarged into analysis of pharmaceutical products manufactured by different firms, but having the same active ingredient at various amounts. In this way it was possible to evaluate the impact of excipients, their types

and quantities, on possibility to confirm the presence of an active ingredient in a pharmaceutical product, as well as determination, in which degree the selected thermal and spectroscopic techniques can be useful for composition evaluation of available in pharmaceutical turnover products and dietary supplements.

The results of thermoanalytical studies have shown that thermal decomposition of methylxanthines is similar one to each other. Not counting aminophylline, the other compounds do not comprise crystalline water. Theophylline, theobromine and caffeine during melting are decomposed, and diprophylline after melting is relatively stable and evaporates at higher temperatures. Thermal decomposition of caffeine and diprophylline can be described as three-stage process, while the disintegration of theophylline, theobromine and aminophylline as two-stage process. In the first stage no processes associated to change of chemical structure take place, which can be noticed in the TG and DTG curves as no mass loss. Occurring at this stage high, narrow and sharply ended peaks in the DTA or DSC curves reflect phase transformations, such as melting or polymorphic transitions. The mass loss in this stage is associated only with dehydration of aminophylline. At the second stage the thermal destruction of studied compounds takes place together with creation of intermediate products, along with 90% mass loss. The charred residue after this stage is burned during the third stage of decomposition.

Analysis of DTA, TG and DTG curves of magnesium organic salts shows that the thermal decomposition of majority of investigated compounds goes through two stages. In the first stage, which comprise the temperature range from 35 to 225°C, dehydration takes place. It is confirmed by mass loss in the TG and DTG curves registered for four magnesium salts: acetate, valproate, lactate and hydrogen aspartate. The peaks in DTA curves also confirm the dehydration. Anhydrous compounds are subjected to total thermal destruction at the second stage with creation of Mg oxide (Zn oxide in the case of Zn hydrogen aspartate) as final product of decomposition. On the other hand, inorganic magnesium compounds – oxide, hydroxide and carbonate are not thermally transformed in the studied range of temperatures. The only exception is magnesium chloride, which goes through dehydration.

For the interpretation of obtained results based on thermal decomposition of purine derivatives and Mg salts, principal component analysis (PCA) was applied. PCA calculations performed for the data obtained from DTA, TG and DTG curves of thermal decomposition of investigated substances have shown that first two principal components (PC1 and PC2) explain together above 80% of variability, and the eigenvalues of PC1 and PC2 are higher than 2. Due to this fact, the relations between the sample mass and heating rate were investigated for each compound in the two-dimensional plot PC1 and PC2. They showed that the heating rate had the

highest impact on their thermal decomposition. Analyzing the influence of sample mass during constant heating rate it was found that the sample mass at 3°C/min heating rate has less impact on the results of thermal decomposition, than at 15°C/min heating rate. Thus, from these investigations it results that the heating rate has its impact on thermal decomposition in higher degree than the sample mass, and the optimum conditions for conducting the studies on thermal decomposition of organic substances is achieved at heating 100 mg samples with the heating rate in the range from 5 to 10°C/min. Moreover, PCA calculations have also revealed that magnesium salts of organic acids with similar chemical structure can be found in PCA plot at close PC1 and PC2 values, which is a proof that their thermal decomposition reflects similarity of their chemical structures.

The results of thermal analysis for huge group of pharmaceutical preparations and dietary supplements have shown that high, narrow and sharply ended endothermic DSC peaks associated to phase transitions, mainly melting and evaporation of studied substances, can be use for identification of these substances in the analyzed products. On possibility to identify the ingredient, massive impact has its concentration recalculated into unit of mass of dragees, tablet or capsule. In the case of preparations containing magnesium salts it was determined that for detection of these compounds in the studied samples, it is possible to use the endothermic DSC peaks associated with dehydration.

Direct FT-IR and Raman spectra analyses doesn't assure reliable identification of studied products, especially when the part of substance constitutes inorganic compounds, which do not give characteristic bands in spectra. Much more reliable results were obtained by application of so called similarity coefficient. The highest values of this coefficient were achieved for FT-IR spectra of theophylline, in the range 89.6–99.01%, which means that the spectra of theophylline preparations almost overlap the spectra of theophylline.

Concluding, the studies with the use of purine derivatives and magnesium salts have shown that in the majority of cases the DSC, FT-IR and Raman techniques can be useful for detecting an active ingredient in the pharmaceutical products and dietary supplements. The measurements performed by these methods are simple and do not require much efforts during preparation of a sample for study. Then huge impact on ability to detect principal constituents has the concentration of these substances in studied products. The results obtained by spectroscopic techniques are complementary in relation to the DSC results, and FT-IR spectroscopy appeared to be more suitable for realization of the aim of studies than Raman spectroscopy.