



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

Panu Profesorowi Markowi Wesołowskiemu
dziękuję za cenne uwagi i pomoc w tworzeniu
niniejszej rozprawy

Pracę dedykuję mojemu Mężowi,
dziękując za motywację

Spis treści

Wykaz używanych skrótów	5
Wstęp	6
Część teoretyczna	9
1. DSC i metody spektroskopowe z zakresu podczerwieni	9
2. Badanie substancji do celów farmaceutycznych	12
2.1 Tożsamość	12
2.2 Formy amorficzne i polimorficzne	13
2.3 Czystość	15
2.4 Zawartość wody i solwaty	17
2.5 Trwałość	20
3. Badanie preparatów farmaceutycznych	23
3.1 Interakcje	23
3.2 Kokryształy	27
3.3 Preparaty gotowe i formy pośrednie do ich wytworzenia	28
3.4 Analiza ilościowa	30
Cel pracy	32
Część eksperymentalna	34
1. Materiały do badań	34
2. Przygotowanie próbek do badań	36
3. Metodyka badań	39
4. Obliczenia statystyczne	41
Wyniki doświadczeń i dyskusja	42
1. Różnicowa kalorymetria skaningowa	42
1.1 Charakterystyka badanych substancji	44
1.2 Paracetamol	46
1.3 Kwas acetylosalicylowy	52
1.4 Metyloksantyny	55
1.5 Podsumowanie	66
2. Metody spektroskopowe	67
2.1 Spektroskopia FTIR	69
2.2 Spektroskopia Ramana	75
2.3 Podsumowanie	76
3. Badania termomikroskopowe	78
3.1 Hypromeloza	78
3.2 Paracetamol	78
3.3 Kwas acetylosalicylowy	81
3.4 Kofeina	83
3.5 Teofilina	85
3.6 Podsumowanie	87

4. Diagramy fazowe	87
4.1 Krzywa rozpuszczalności	88
4.2 Krzywa mieszalności	89
4.3 Krzywa przemiany szklistej	90
4.4 Wyznaczanie diagramu fazowego	90
4.5 Charakterystyka diagramów fazowych	91
4.6 Podsumowanie	106
Wnioski	109
Bibliografia	111
Streszczenie	122
Summary	125

Wykaz używanych skrótów

API – (*Active Pharmaceutical Ingredient*) – aktywny składnik farmaceutyczny
ASA – kwas acetylosalicylowy
ATR – (*Attenuated Total Reflection*) – osłabione całkowite odbicie
DPI – (*Dry Powder Inhaler*) – sucha inhalacja proszkowa
DSC – (*Differential Scanning Calorimetry*) – różnicowa kalorymetria skaningowa
DTA – (*Differential Thermal Analysis*) – różnicowa analiza termiczna
EMA – (*European Medicines Agency*) – Europejska Agencja Leków
FIR – (*Far Infrared*) – spektroskopia w dalekiej podczerwieni
FT – (*Fourier Transform*) – transformacja Fouriera
HPLC – (*High-Performance Liquid Chromatography*) – wysokosprawna chromatografia cieczowa
HPMC – hypromeloza, hydroksypropylometyloceluloza
HSDSC – (*High-Sensitivity Differential Scanning Calorimetry*) – różnicowa kalorymetria skaningowa o wysokiej czułości
Hyper-DSC – (*High Speed Differential Scanning Calorimetry*) – różnicowa kalorymetria skaningowa o dużej szybkości ogrzewania
ICH – (*International Council on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use*) – Międzynarodowa Rada Harmonizacji Wymagań Technicznych dla Rejestracji Produktów Leczniczych Stosowanych u Ludzi
IR – (*Infrared*) – podczerwień
KOF – kofeina
LOD – (*Limit of detection*) – granica wykrywalności
LOQ – (*Limit of Quantification*) – granica oznaczalności
MT-DSC – (*Modulated Temperature Differential Scanning Calorimetry*) – różnicowa kalorymetria skaningowa z modulowaną temperaturą
MIR – (*Mid Infrared*) – spektroskopia w podstawowej podczerwieni
MS – (*Mass Spectrometry*) – spektrometria mas
NIR – (*Near Infrared*) – spektroskopia w bliskiej podczerwieni
NMR – (*Nuclear Magnetic Resonance*) – spektroskopia magnetycznego rezonansu jądrowego
PAR – paracetamol
PAT – (*Process Analytical Technology*) – technologia analizy procesu
PDE – (*Permissible Daily Exposure*) – dopuszczalna dzienna ekspozycja
PVP – (*Polyvinylpyrrolidone*) – poliwinylpirolidon
PXRD – (*Powder X-Ray Diffraction*) – proszkowa dyfrakcyjna analiza rentgenowska
QbD – (*Quality by Design*) – program zapewnienia jakości przez prawidłowe zaprojektowanie procesów technologicznych
SORS – (*Spatially Offset Raman Spectroscopy*) – spektroskopia ramanowska przesunięcia przestrzennego
ssNMR – (*Solid-state Nuclear Magnetic Resonance*) – spektroskopia jądrowego rezonansu magnetycznego ciała stałego
TF – teofilina
TG – (*Thermogravimetry*) – termogravimetria
UV-Vis – (*Ultraviolet-visible*) – spektroskopia w nadfiolecie i świetle widzialnym

WSTĘP

Przemysł farmaceutyczny rozwija się bardzo dynamicznie. Jest on ukierunkowany na stałe postacie leku, ponieważ te formy stanowią znaczący udział w rynku farmaceutycznym. Bezpieczeństwo farmakoterapii wymaga od producentów dbałości o jakość substancji leczniczych i pomocniczych stosowanych w produkcji preparatów, jak i kontroli produktu finalnego. Niezależnie od pochodzenia składników, na producentów nałożony jest obowiązek ich kontroli pod względem jakości. Szczegółowe wymagania nakłada ustawodawca w formie określonej przez farmakopee: Europejską, Polską oraz odpowiednie obowiązujące w poszczególnych państwach. Dokumenty te opisują w formie monografii ogólne wymagania jakim podlegają substancje do celów farmaceutycznych i poszczególne postacie leku oraz w formie monografii szczegółowych wymagania dla konkretnych substancji. Dodatkowo, Europejska Agencja Leków (*European Medicines Agency* - EMEA) z ramienia Wspólnoty Europejskiej, Stanów Zjednoczonych i Japonii, działając przez Międzynarodową Radę Harmonizacji Wymagań Technicznych dla Rejestracji Produktów Leczniczych Stosowanych u Ludzi (*International Council on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use* - ICH) nakłada obowiązek kontroli substancji, produktów farmaceutycznych i procesu produkcyjnego, zgodnie z wymaganiami określonymi w procesie rejestracji produktów leczniczych.

Jakość substancji leczniczych i pomocniczych stosowanych do produkcji preparatów farmaceutycznych potwierdza się przez spełnienie szeregu wymagań sformułowanych w obowiązujących dokumentach. Z punktu widzenia biodostępności i właściwości fizykochemicznych wpływających na proces formulacji istotna jest informacja dotycząca budowy krystalicznej lub bezpostaciowej substancji przeznaczonych do celów farmaceutycznych [1]. Konieczna jest też identyfikacja zanieczyszczeń i substancji pokrewnych oraz porównanie ich poziomów z kryteriami akceptacji podanymi szczegółowo w monografiach substancji. Dokument ICH klasyfikuje zanieczyszczenia w zależności od charakteru chemicznego i czasu powstania, zwracając szczególną uwagę na związki, które mogą być toksyczne lub wywoływać działanie farmakologiczne [2]. Ścisłej kontroli podlegają również pozostałości rozpuszczalników, których akceptowalny poziom ustala się w oparciu o dopuszczalną dzienną ekspozycję (*Permissible Daily Exposure* - PDE) [1,3].

W farmakopei informacyjnie określone są również właściwości fizykochemiczne oraz metody stosowane do potwierdzenia tożsamości substancji przeznaczonych do celów farmaceutycznych [1]. Potwierdzenie tożsamości polega na udowodnieniu identyczności substancji badanej z wzorcem. Wymagane jest również oznaczenie zawartości przy użyciu metod

właściwych do badania poszczególnych aktywnych składników farmaceutycznych (*Active Pharmaceutical Ingredient* – API). Dla substancji stosowanych do produkcji leków jałowych wymagana jest dodatkowo odpowiednia czystość mikrobiologiczna i niekiedy apirogenność. Zgodnie z wytycznymi EMEA substancje lecznicze podlegają badaniu trwałości wymaganemu przed rozpoczęciem procesu aplikacji rejestracyjnej [4,5,6]. W czasie testu sprawdza się wpływ czynników środowiskowych: temperatury, wilgoci i światła na wewnętrzną stabilność cząsteczek, identyfikuje się produkty rozkładu i ustala drogę ewentualnej degradacji. Poszukuje się zależności, które pozwolą dopasować kinetykę rozkładu do modelu matematycznego. Dzięki temu możliwe jest długofalowe wnioskowanie nt. trwałości substancji.

Jakość gotowych preparatów farmaceutycznych musi być bardzo wysoka, a każda seria produkcyjna dokładnie kontrolowana, co potwierdza się przez przeprowadzenie szeregu badań i porównanie uzyskanych wyników z założonymi kryteriami. Ma to na celu zapewnienie możliwie wysokiego bezpieczeństwa farmakoterapii, trwałości preparatu oraz komfortu użytkowania. Stałe, dozowane postacie leku podlegają farmakopealnym kryteriom pod względem jednolitości jednostek preparatów dawkowanych, na podstawie których ocenia się zgodność zawartości substancji leczniczej w leku z dawką deklarowaną [1]. Należy również potwierdzić jednolitość masy poszczególnych jednostek dawkowania przez porównanie odchyleń od masy średniej. Stałe postacie leku, które zawierają pojedyncze dawki substancji leczniczej (lub leczniczych) podlegają badaniu jednolitości zawartości substancji czynnej, która jest miarą odchyleń zawartości w poszczególnych jednostkach od zawartości średniej. Doustne postacie leku umieszczone w opakowaniu wielodawkowym kontroluje się pod względem jednolitości masy dawek pobieranych z pojemników wielodawkowych. Należy również przeprowadzić badanie uwalniania substancji czynnej, które ma na celu określenie zgodności szybkości uwalniania substancji leczniczej lub leczniczych z wymaganiami farmakopealnymi dotyczącymi odsetka dawki uwolnionej z postaci leku w określonym czasie. Tabletki, kapsułki, czopki i globulki podlegają też pomiarowi czasu potrzebnego do całkowitej deformacji postaci leku. Badaniu temu nie podlegają formy o zmodyfikowanym uwalnianiu. Proszki i granulatory analizuje się pod względem stopnia rozdrobnienia z zastosowaniem analizy sitowej.

Ważnym w technologii postaci leku jest również czas zsypywania, który ocenia zdolność proszku lub granulatu do pionowego przemieszczania oraz objętości nasypowej, która jest miarą zdolności proszku lub granulatu do zmniejszenia objętości pod wpływem ubijania. Niektóre spośród stałych postaci leku dodatkowo należy kontrolować pod względem odporności mechanicznej. Tabletki uzyskane w procesie kompresji muszą wykazywać odpowiednią wytrzymałość na zgniatanie, zaś tabletki niepowlekanie odporność na ścieranie. Gotowe preparaty

farmaceutyczne również podlegają badaniu trwałości, które planuje się w oparciu o właściwości substancji czynnej [4,5,6,7,8]. Ma ono na celu ustalenie terminu ważności wszystkich serii produkcyjnych preparatu zawierających tą samą substancję czynną i wytwarzanych w powtarzalnych warunkach oraz opracowanie warunków przechowywania preparatu, które umieszczone zostaną na etykietach opakowań. Kontroli podlega również zawartość pierwiastków o potencjalnie szkodliwym działaniu, dla których określono z uwzględnieniem różnych dróg podania dopuszczalną dzienną ekspozycję (PDE) [9].

Zapewnienie wiarygodności wyników uzyskanych w badaniach prowadzonych w celu potwierdzenia jakości substancji przeznaczonych do celów farmaceutycznych oraz gotowych preparatów wymaga odpowiedniego doboru metod analitycznych i prawidłowego procesu ich walidacji. Wciąż poszukiwane są nowe metody, które zapewnią będą możliwie wysoką jakość wyników uzyskanych w krótkim czasie, przy użyciu możliwie niewielkiej próbki i niskich kosztach. Również metody wcześniej opracowane często nabierają nowych zastosowań. Jest to możliwe dzięki przystosowaniu ich do analiz innych produktów oraz wprowadzenie modyfikacji poprawiających jakość uzyskanych wyników i rozszerzających ich użyteczność.

CZEŚĆ TEORETYCZNA

W kontroli jakości substancji do celów farmaceutycznych oraz gotowych produktów farmaceutycznych korzysta się z wielu metod analitycznych, również metod analizy termicznej, w tym szczególnie różnicowej kalorymetrii skaningowej (*Differential Scanning Calorimetry - DSC*), często stosowanej równolegle z termogravimetrią (*Thermogravimetry – TG*) [11]. Temperatury przemian fazowych, kształt i intensywność sygnałów stanowią podstawę do wielokierunkowego wnioskowania nt. tożsamości, amorficzności lub krystaliczności, czystości, trwałości, interakcji pomiędzy składnikami czy zawartości substancji w produkcie.

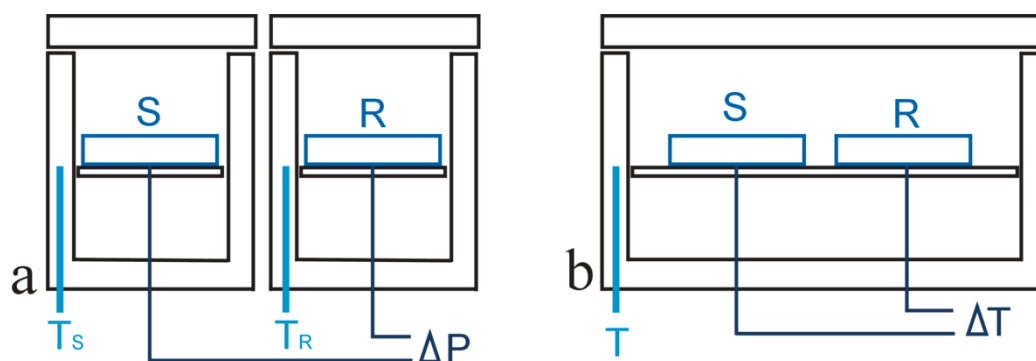
W analizie farmaceutycznej szeroko wykorzystuje się również metody spektroskopowe, w szczególności w zakresie podczerwieni, często dodatkowo z transformacją Fouriera (*Fourier Transform – FT*) oraz spektroskopię Ramana [10]. Zastosowanie tych niedestrukcyjnych metod pozwala na uzyskanie w krótkim czasie informacji na temat tożsamości i jakości substancji do celów farmaceutycznych oraz gotowych preparatów.

1. DSC i metody spektroskopowe z zakresu podczerwieni

Różnicowa kalorymetria skaningowa

Różnicowa kalorymetria skaningowa należy do grupy metod termoanalitycznych, które polegają na badaniu przemian fazowych zachodzących podczas ogrzewania lub chłodzenia substancji [11]. W DSC mierzy się różnicę ciepła dostarczonego do próbki badanej i odniesienia, potrzebnego do utrzymania tej samej, zwykle liniowo zmieniającej się temperatury.

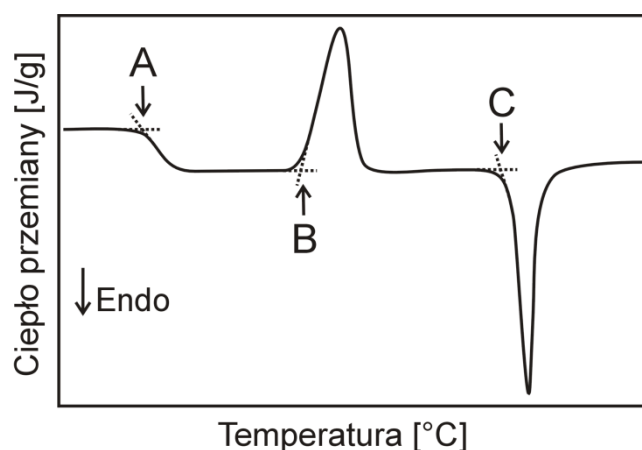
Środowisko badania stanowi piec, w którym pomiar temperatury próbek odbywa się za pomocą termopar lub czujników oporowych [12,13]. Substancja badana umieszczona jest w tyglu, zwykle aluminiowym, natomiast odnośnik stanowi tlenek glinu lub pusty tygiel. Wyróżnia się dwa typy aparatów do DSC. Pierwszym są aparaty z kompensacją mocy (*Power compensation DSC*), w których próbki badana i odniesienia znajdują się w oddzielnych, jednakowych, niezależnie sterowanych piecach. Jeśli wystąpią różnice w poborze ciepła między próbką i odnośnikiem, rejestrowane są różnice w poborze energii potrzebnej do zachowania zadanej temperatury. W aparatach typu przepływu ciepła (*Heat-flux DSC*) próbki umieszczone są w jednym piecu, wyposażonym we wspólny element ogrzewający. Jeśli wystąpi różnica w swobodnym przepływie ciepła z otoczenia do próbki badanej i do próbki odniesienia, aparat rejestruje to w postaci różnicy temperatur pomiędzy próbkami. Rys. 1 przedstawia schematyczną budowę aparatów do DSC.



Rys. 1. Schematyczna budowa aparatów do DSC: a) z kompensacją mocy i b) typu przepływowego. S i R - odpowiednio próbka badana i odniesienia, T – temperatura, ΔT – różnica temperatur, ΔP – różnica mocy.

Efektom pomiaru DSC jest krzywa obrazująca różnicę przepływającego pomiędzy próbkami ciepła (ΔH) w funkcji temperatury (T) lub czasu (t). Wystąpienie różnic w przepływie ciepła do próbki badanej w porównaniu z próbką odniesienia związane jest z wystąpieniem zjawisk fizykochemicznych przebiegających ze zmianą entalpii. Wśród tych zjawisk wyróżnić można takie, które przebiegają z wydzielaniem energii przez próbkę (egzotermiczne), do których należą krystalizacja i rozkład. Wyróżniamy również zjawiska endotermiczne, przebiegające z pobieraniem ciepła przez próbkę, do których należą: topnienie, zeszklenie, parowanie i dehydratacja.

Na krzywych DSC substancji organicznych, do których zwykle należą substancje przeznaczone do celów farmaceutycznych, najbardziej charakterystyczne są efekty związane z przemianą szklistą postaci amorficznej (A), jej krystalizacją (B) i topnieniem postaci krystalicznej (C). Modelową krzywą DSC obrazującą te zjawiska przedstawia Rys. 2.



Rys. 2. Modelowa krzywa DSC (na podstawie krzywej DSC tereftalanu polietylu) [13].

Zakresy temperatur, w których zachodzą przemiany w substancji w warunkach zmieniającej się temperatury są charakterystyczne dla poszczególnych związków.

Spektroskopia w podczerwieni

Metody spektroskopowe z zakresu podczerwieni to dział spektroskopii cząsteczkowej, bazującej na oddziaływaniu promieniowania elektromagnetycznego z wiązaniami w grupach funkcyjnych [10,14,15]. Zakresy długości fal, jakie oddziałują z poszczególnymi wiązaniami w strukturze związków chemicznych, są dla tych wiązań charakterystyczne.

W zakresie podczerwieni wyróżnia się spektroskopię absorpcyjną, w której oddziaływanie polega na pochłanianiu promieniowania przez układy atomów grupach funkcyjnych. Zdolne do absorpcji promieniowania w tym zakresie są układy atomów, w których występuje różnica momentu dipolowego lub w których oddziaływanie z promieniowaniem powoduje chwilowe przesunięcie ładunku. Efektem jest zmiana energii cząsteczki na poziomie oscylacyjnym i rotacyjnym. Uzyskuje się widmo przedstawiające część zaabsorbowanego (absorbancja) lub przepuszczonego (transmitancja) promieniowania dla poszczególnych długości fali [μm] lub liczb falowych [cm^{-1}].

W zakresie podczerwieni wyróżnia się podczerwień bliską (*Near Infrared* - NIR), podstawową (*Mid Infrared* - MIR) nazywaną zwyczajowo podczerwienią (*Infrared* - IR) oraz daleką (*Far Infrared* - FIR). Kształt widma w zakresie promieniowania NIR zależy od wzajemnych oddziaływań w grupach funkcyjnych. Jest bardzo wiele zmiennych wpływających na ten kształt, stąd bezpośrednia interpretacja i wnioskowanie na temat budowy związku jest utrudnione. Możliwe jest natomiast potwierdzenie tożsamości substancji przez porównanie jej widma NIR z widmem substancji referencyjnej. Absorpcja promieniowania w zakresie MIR powoduje zmianę długości lub konformacji wiązań w układach atomów, w których występuje różnica momentu dipolowego. Uzyskuje się widmo, którego pasma odpowiadają poszczególnym wiązaniami polarnym w cząsteczce. Zakresy liczb falowych w jakich występują pasma są charakterystyczne dla poszczególnych wiązań w ugrupowaniach związku. Promieniowanie z zakresu FIR powoduje zmianę w energii wiązań szkieletu cząsteczki z podstawnikami o dużej masie lub z ligandami w kompleksach.

Spektroskopia Ramana

Spektroskopia Ramana należy do technik refleksyjnych, w których parametrem mierzonym jest światło odbite i rozproszone [10,15]. Oddziaływanie promieniowania elektromagnetycznego z materią opiera się w tej metodzie na wprowadzeniu cząsteczki w wyższy, nietrwały stan energetyczny związany ze zmianą polaryzowalności. Następnie odbywa się powrót

cząsteczki do stanu energetycznie niższego z równoczesną emisją nadwyżki energii. Użyteczne analitycznie są zwykle pasma odpowiadające obniżeniu energii do stanu energetycznie wyższego niż stan podstawowy (rozproszenie stokesowskie). W tej metodzie uzyskuje się widmo pasm emitowanych jako fale o poszczególnych liczbach falowych, nazywanych przesunięciem Ramana [cm^{-1}]. Zakres długości fal odpowiadający pasmom w widmie Ramana odpowiada liczbom falowym podstawowej podczerwieni. Podobnie jak w IR, zakresy długości fal stanowią wartości charakterystyczne dla poszczególnych wiązań w grupach funkcyjnych. W metodzie tej uzyskuje się pasma odpowiadające w szczególności wiązaniom o małej różnicy momentu dipolowego, pozostałe pasma mają natomiast bardzo małą intensywność. Spektroskopia Ramana i IR stanowią więc metody komplementarne, których równoczesne stosowanie umożliwia szczegółową interpretację struktury i oddziaływań wewnątrz- i międzycząsteczkowych.

2. Badanie substancji do celów farmaceutycznych

Substancje wykorzystywane w produkcji farmaceutycznej syntezowane są niekiedy przez wytwórców, którzy następnie używają ich w formulacji gotowych preparatów. Często też producenci leków zaopatrują się w substancje potrzebne do produkcji w firmach zewnętrznych. W obu przypadkach, przed użyciem substancji do produkcji preparatów farmaceutycznych konieczne jest potwierdzenie ich tożsamości, oraz określenie form polimorficznych lub stwierdzenie amorficzności, ocena czystości przez oznaczenie produktów ubocznych i pozostałości substancji używanych w procesie syntezy.

2.1 Tożsamość

Podstawowymi metodami wykorzystywanymi w celu potwierdzenia tożsamości substancji przeznaczonych do celów farmaceutycznych są metody spektroskopowe z zakresu podczerwieni, szczególnie bliskiej i podstawowej oraz spektroskopia Ramana [16]. Zaletą spektroskopii Ramana jest dodatkowo możliwość badania substancji w niektórych rodzajach opakowań, co umożliwia zastosowanie metody do badania substancji bez zmiany warunków ich przechowywania, dostępu powietrza i światła. Modyfikacja metody, jaką jest przesunięcie przestrzenne (*Spatially Offset Raman Spectroscopy* - SORS) rozszerza zastosowanie spektroskopii Ramana o badanie substancji również w opakowaniach z barwnego szkła, tworzyw sztucznych, papieru, a także w opakowaniach wielowarstwowych [17]. IR i spektroskopia Ramana użyteczne są również w badaniach wewnątrzprocesowych, np. w monitorowaniu procesu granulacji na gorąco, oraz międzyprocesowych, np. badaniu granulatów będących etapem procesu tabletkowania [18].

Potwierdzenie tożsamości substancji metodami IR i spektroskopią Ramana odbywa się zwykle przez porównanie uzyskanego widma z widmem substancji referencyjnej lub z widmami publikowanymi w bibliotekach widm. Przykładem wykorzystania obu metod jest badanie struktury tedizolidu, przeznaczonego do celów farmaceutycznych [19]. Analizowano poszczególne pasma na widmach FTIR i Ramana odpowiadające wiązaniom w cząsteczce. Podobnie, na podstawie widm FTIR potwierdzono tożsamość entakaponu [20]. W badaniach tożsamości substancji szeroko wykorzystuje się też metody chromatograficzne, szczególnie wysokosprawną chromatografię cieczową (*High-Performance Liquid Chromatography* - HPLC) i spektroskopię magnetycznego rezonansu jądrowego (*Nuclear Magnetic Resonance* - NMR). Obecnie często korzysta się ze spektrometrii mas (*Mass Spectrometry* - MS) lub technik sprzężonych, które umożliwiają badanie tej samej próbki kilkoma metodami w tym samym czasie [11,21]. Użyteczna jest również DSC, w której temperatura odpowiadająca procesowi zeszklenia postaci amorficznej lub topnienia substancji krystalicznej jest wartością charakterystyczną dla poszczególnych związków chemicznych [22].

2.2 Formy amorficzne i polimorficzne

Badanie tożsamości substancji przeznaczonych do celów farmaceutycznych nie ogranicza się zwykle do potwierdzenia struktury chemicznej, ale wymaga również ustalenia, czy substancja występuje w postaci amorficznej czy krystalicznej [23,24]. Znajomość postaci, w jakiej występuje substancja, szczególnie substancja czynna, jest istotna z punktu widzenia jej rozpuszczalności, trwałości, biodostępności i właściwości technologicznych, szczególnie ważnych w procesie formulacji. Istotna jest także informacja dotycząca niezmienności form polimorficznych lub amorficznej w trakcie procesu produkcyjnego, szczególnie jeśli wykorzystywana jest w nim woda. W celu ustalenia formy krystalicznej bądź amorficznej, lub proporcji w jakich występują te formy w substancji przeznaczonej do celów farmaceutycznych, wykorzystać można proszkową dyfrakcyjną analizę rentgenowską (*Powder X-Ray Diffraction* - PXRD) i spektroskopię jądrowego rezonansu magnetycznego ciała stałego (*Solid-state Nuclear Magnetic Resonance* - ssNMR) [25,26,27,28]. Użyteczne są również metody spektroskopowe z zakresu bliskiej i podstawowej podczerwieni, ponieważ w widmach poszczególnych form krystalicznych lub amorficznej tej samej substancji widoczne są niewielkie różnice w położeniu pasm. Przykładem wykorzystania metod FTIR, spektroskopii Ramana i DSC jest badanie dwóch form krystalicznych chlorowodoru buspironu [27]. W widmie formy II zidentyfikowano pik, nie występujący w widmie formy I, który był proporcjonalny do zawartości tej formy. Używając wyżej wymienionych metod badano również trzy formy polimorficzne torasemidu, które różniły się temperaturą topnienia [29]. Stwierdzono również niewielkie różnice w widmach FTIR i Ramana obu form.

Do badania substancji tworzącej różne formy krystaliczne i amorficzną, jako jedne z podstawowych wykorzystuje się metody analizy termicznej, najczęściej DSC. Metoda pozwala, w oparciu o znane temperatury przejść fazowych i różne zachowanie postaci krystalicznych i amorficznej podczas ogrzewania, zidentyfikować poszczególne formy, a ponadto określić proporcje, w jakich te formy występują w substancji przeznaczonej do celów farmaceutycznych. Formę amorficzną można zidentyfikować na podstawie łagodnego efektu endotermicznego, występującego na krzywej DSC w zakresie niższych temperatur, związanego z przemianą szklistą. W nieco wyższej temperaturze forma amorficzna może ulegać krystalizacji, co odzwierciedla pik egzotermiczny. Na krzywej DSC formy krystalicznej występuje zwykle duży, ostro zakończony endotermiczny pik odzwierciedlający topnienie substancji. Poszczególne formy krystaliczne tej samej substancji topią się w różnych temperaturach. Dodatkowo, zastosowanie zmodyfikowanej DSC, jaką jest różnicowa kalorymetria skaningowa z modulowaną temperaturą (*Modulated Temperature Differential Scanning Calorimetry* – MT-DSC) umożliwia rozdzielenie nakładających się sygnałów spowodowanych różnymi przemianami fazowymi oraz detekcję bardzo małych zawartości poszczególnych form polimorficznych lub amorficznej [22,30,31,32].

Modyfikacją różnicowej kalorymetrii skaningowej są też przyrządy o bardzo dużej szybkości ogrzewania (*High Speed Differential Scanning Calorimetry* - Hyper-DSC), które umożliwiają wykrycie bardzo małych zawartości jednej z form polimorficznych lub amorficznej [23]. Czas ogrzewania jest w tej metodzie zbyt krótki, żeby substancja czynna uległa rekrytalizacji, w związku z czym proces ten nie zachodzi, a wynik badania stanowi pojedynczy, endotermiczny pik, związany z topnieniem formy o niższej temperaturze topnienia. Przykładem wykorzystania DSC w badaniu form polimorficznych jest analiza ilościowa dwóch form krystalicznych nateglinidu w ich mieszaninach fizycznych o różnej proporcji [33]. Topnienie obu postaci krystalicznych następowało w różnych temperaturach, zaś entalpia topnienia każdej z form była proporcjonalna do udziału składnika w mieszaninie.

W oparciu o entalpię przemiany szklistej możliwe jest użycie DSC do oznaczenia niewielkich ilości formy amorficznej tworzącej się podczas przechowywania produktów zawierających substancję czynną w postaci krystalicznej [34]. Metoda stosowana jest również do badania wpływu warunków otrzymywania i rodzaju rozpuszczalników na krystaliczność substancji do celów farmaceutycznych, np. chlorku trospium [31] i laktozy [35]. Badano też wpływ sposobu otrzymywania: metodą mieszania, odparowania rozpuszczalnika, suszenia rozpyłowego, liofilizacji oraz z wykorzystaniem ditlenku węgla w stanie nadkrytycznym, na krystaliczność indometacyny i olanzapiny w postaci kompleksów z β -cyklodekstryną [36,37]. DSC stosowana jest również w badaniu stabilności formy krystalicznej. Metoda została

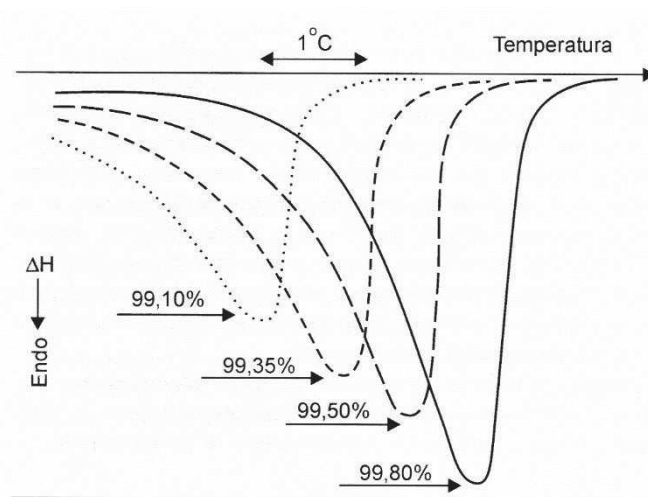
wykorzystana do badania trwałości formy krystalicznej koenzymu Q10 w postaci kompleksów otrzymanych metodą suszenia rozpyłowego [38]. Kompleksy stanowiły formę suchą do wytworzenia nanoemulsji. Możliwe jest również wykorzystanie DSC do oznaczenia proporcji form amorficznej i krystalicznej uzyskanych w procesie syntezy, mielenia lub liofilizacji [39,40].

Często najbardziej pożądaną postacią substancji czynnej jest forma amorficzna, która w większości przypadków wykazuje lepszą rozpuszczalność i biodostępność niż chemicznie tożsama postać krystaliczna. Metody analizy termicznej, szczególnie DSC i TG, są użyteczne w ocenie amorficzności substancji przeznaczonej do celów farmaceutycznych [40,41,42,43]. Metody te wykorzystuje się szczególnie podczas opracowywania optymalnych warunków otrzymywania postaci amorficznej substancji oraz w kontroli stabilności tej formy w mieszaninach z polimerami. Przykładem takiego wykorzystania DSC i TG jest ocena amorficzności ciprofloksacyny [40]. Badano wpływ dodatku trehalozy, mannitolu i hypromelozy na trwałość amorficznej formy substancji leczniczej w nanocząstkach otrzymanych w procesie liofilizacji. Podobnie, użyto DSC i TG do badania amorficzności ciprofloksacyny uzyskanej w procesie suszenia rozpyłowego z roztworu zawierającego siarczan dekstranu i surfaktant [41]. Przeprowadzono też badania DSC i różnicową analizę termiczną (*Differential Thermal Analysis – DTA*) amorficznej formy paracetamolu współstrącanego z fenazonem w różnych proporcjach [44]. Stwierdzono także amorficzność laktozy otrzymanej w procesie suszenia rozpyłowego z roztworu zawierającego rozpuszczalne polisacharydy soi [35]. DSC przydatna jest w poszukiwaniu substancji czynnych, których współstrącanie pozwala na uzyskanie mieszanin trwałych form amorficznych obu substancji. Jest to istotne w procesie opracowywania preparatów farmaceutycznych, bardziej korzystnych z biologicznego i terapeutycznego punktu widzenia.

Spośród faz, w których występują substancje wyróżnia się również mezofazy, nazywane ciekłymi kryształami. Są to formy posiadające cechy uporządkowania charakterystycznego dla kryształów i jednocześnie pewnego stopnia ruchliwość wewnętrzną cząsteczek typową dla cieczy. DSC jest wykorzystywana do badania substancji o takim charakterze, np. itrakonazolu [45]. Przejście substancji w stan ciekłego kryształu widoczne jest na krzywej DSC w postaci dodatkowego, egzotermicznego piku związanego z wewnętrzną relaksacją cząsteczek.

2.3 Czystość

W ocenie czystości substancji przeznaczonych do celów farmaceutycznych szeroko wykorzystuje się DSC, często równoległe z metodami chromatograficznymi. Ocena ilościowa zanieczyszczeń bazuje na obniżeniu temperatury topnienia substancji zanieczyszczonej w porównaniu z temperaturą topnienia chemicznie czystej substancji, co przedstawia Rys. 3.



Rys. 3. Krzywe DSC próbek różniących się zawartością zanieczyszczeń [1].

Oznaczenie zanieczyszczeń jest możliwe dzięki zastosowaniu równania van't Hoffa, które przedstawia zależność temperatury topnienia substancji zanieczyszczonej (T) od ułamka molowego zanieczyszczeń w próbce badanej (X). W oznaczeniu wykorzystuje się frakcje molowe (F) substancji stopionej w poszczególnych temperaturach, z uwzględnieniem temperatury topnienia chemicznie czystej substancji (T_0), ciepła molowego jej topnienia (ΔH_0) i stałej gazowej (R) [1,22,46,47]:

$$T = T_0 - \frac{RT_0^2 X}{\Delta H_0 F}$$

Obniżenie temperatury topnienia substancji zanieczyszczonej związane jest z utworzeniem niewielkiej ilości mieszaniny eutektycznej pomiędzy substancją badaną, a zanieczyszczeniami. Temperatura topnienia badanej substancji (T) jest odwrotnie proporcjonalna do frakcji molowej stopionej próbki ($1/F$). Zależność ta jest liniowa i umożliwia ilościową analizę zanieczyszczeń. Takie zastosowanie DSC zakłada brak innego niż tworzenie eutektyków rodzaju oddziaływań między substancją badaną a zanieczyszczeniem oraz brak wzajemnego rozpuszczania składników poniżej temperatury topnienia mieszaniny. Mogą one bowiem powodować odstępstwa od liniowości. Wyniki oznaczania czystości uzyskane metodą DSC są zgodne z wynikami otrzymanymi metodami chromatograficznymi. Zwykle też nie różnią się istotnie od czystości deklarowanej przez producenta dla materiałów referencyjnych. Tą metodą można badać czystość substancji, w których zawartość zanieczyszczeń nie przekracza 2%.

DSC pozwala ocenić wyłącznie całkowitą zawartość zanieczyszczeń nie umożliwia natomiast ich identyfikacji. Wymagana jest też termiczna trwałość zanieczyszczeń poniżej temperatury topnienia substancji badanej [1,46,47,49]. Nie można tą metodą oznaczyć czystości substancji lotnych, bezpostaciowych, solwatów i związków, których forma zmienia się poniżej

temperatury topnienia substancji badanej. Również nie można oznaczyć zanieczyszczeń solami nieorganicznymi i substancjami, które nie rozpuszczają się w stopionej substancji badanej i nie powodują obniżenia jej temperatury topnienia. W badaniu czystości, często równoległe z DSC, stosuje się inne metody w celu identyfikacji zanieczyszczeń. Dobre wyniki uzyskuje się w oznaczaniu produktów rozpadu i związków pokrewnych, nawet tych o budowie chemicznej bardzo zbliżonej do substancji czynnej. W literaturze znajdują się liczne przykłady zastosowania DSC do oceny czystości substancji do celów farmaceutycznych: np. chloramfenikolu, [46], mezylanu doksazosyny [48], parekoksybu i waldekoksybu [49]. Liczne są przykłady zastosowania DSC do badania czystości substancji referencyjnych: paracetamolu, loratadyny i N-metylo-desloratadyny, kofeiny, kwasu salicylowego i acetylosalicylowego, chlorowodoru labetalolu, bisakodylu i dipropionianu betametazonu [47], teofiliny [50], aetanilidu [51] i kwasu ferulowego [52].

Ze względu na dobrą precyzję wyników uzyskiwanych za pomocą DSC, metoda znajduje zastosowanie w procesie certyfikacji materiałów referencyjnych. Przykładem takiego jej wykorzystania jest ocena czystości baikaleiny, która jest substancją pochodzenia naturalnego wyizolowaną z rośliny, tarczycy bajkalskiej (*łac: Scutellaria baicalensis Georgi*) [53]. Ocena czystości z wykorzystaniem DSC stanowiła część badań w procesie certyfikacji. DSC wykorzystana została również do oceny czystości paracetamolu, uzyskanego w procesie wielokrotnej rekrytalizacji, w porównaniu z dostępnymi na rynku materiałami referencyjnymi tej substancji [54].

Ocena czystości substancji przeznaczonych do celów farmaceutycznych może opierać się również na wynikach uzyskanych metodami spektroskopii w podczerwieni. Polega ona na szczegółowej analizie widm, szczególnie porównaniu ich z widmami substancji referencyjnych o wysokiej czystości oraz charakterystyce dodatkowych pasm pojawiających się w widmach substancji badanej i pasm, które uległy przesunięciu lub nie pojawiły się w widmie. Często wykorzystanie metod spektroskopowych w ocenie czystości opiera się na charakteryzowaniu zanieczyszczeń izolowanych uprzednio metodami chromatograficznymi. W ten sposób oceniano np. zanieczyszczenia lizynoprilu [55]. Równoległe przeprowadzenie badań metodami IR i spektroskopią Ramana wykorzystano również w ocenie czystości enancjomerycznej substancji, np. tedizolidu [19].

2.4 Zawartość wody i solwaty

Zawartość wody w substancji przeznaczonej do celów farmaceutycznych, szczególnie w postaci sproszkowanej, jest istotna z punktu widzenia procesu technologicznego i trwałości produktu. Podstawowym sposobem oznaczania niewielkich ilości wody w substancji jest metoda

miareczkowa Karla-Fishera. Jej zastosowanie jest jednak ograniczone do substancji całkowicie rozpuszczalnych w rozpuszczalnikach organicznych. Stosowana jest też farmakopealna metoda polegająca na określeniu straty masy po suszeniu. Metoda ta uniemożliwia odróżnienie ubytku masy związanego z odparowaniem wody od ubytku masy spowodowanego uwolnieniem innych substancji lotnych w warunkach oznaczenia. Z uwagi na dokładność procesu ważenia, konieczne są duże odważki badanych substancji. W celu określenia zawartości wody, niezależnie od rozpuszczalności substancji, wykorzystywana jest również DSC, która umożliwia wykonanie analizy z użyciem niewielkiej ilości substancji badanej [56,57,58]. Jest to możliwe dzięki endotermicznym efektom związanym z parowaniem i wrzeniem, które widoczne są na krzywych DSC, niekiedy jednak w formie rozmytego sygnału, którego entalpia proporcjonalna jest do zawartości wody w próbce. Również obecność innych lotnych rozpuszczalników może uwidaczniać się na krzywej DSC, jak np. w próbkach liofilizatów otrzymywanych w celu uzyskania nanocząstek kurkuminy, w przypadku których obserwowano oddzielne sygnały związane z odparowaniem wody i innych użytych rozpuszczalników [43].

Hydraty tworzone przez substancje lecznicze stanowią niekiedy odmienne formy krystaliczne w porównaniu z bezwodną substancją [59]. Zjawisko to, podobnie jak tworzenie solwatów, opisuje się jako pseudopolimorfizm. Substancja przeznaczona do celów farmaceutycznych może ulegać hydratacji w procesie formulacji, np. podczas granulacji na mokro lub w czasie przechowywania. Zjawisko to występuje m.in. w przypadku kofeiny, teofiliny, chlorpromazyny, nitrofurantoiny, oksytetracykliny i fenobarbitalu. Niektóre substancje lecznicze, np. azytromycyna, cefaleksyna, cytrynian sildenafilu, są wykorzystywane w preparatach farmaceutycznych w postaci uwodnionej (hydratów) [60]. Dehydratacja jest efektem termicznym obserwowanym na krzywej DSC często w innej temperaturze, niż parowanie wody, dzięki temu na krzywych DSC obserwować można oba te zjawiska jednocześnie. Dodatkowo, użycie DSC umożliwia obserwację procesu dehydratacji i określenie warunków tworzenia formy amorficznej lub krystalicznej. W ten sposób badano proces dehydratacji dipiwoksilu adefowiru, który wykorzystywany był wcześniej w formie bezwodnych lub dwuwodnych kryształów. Podczas badań uzyskano, zależnie od szybkości ogrzewania i chłodzenia próbki, nie znane wcześniej formy: krystaliczną i amorficzną. Również z terfenadyny otrzymywanej w procesie krystalizacji z rozpuszczalników organicznych z dodatkiem różnych ilości wody uzyskać można odmienne formy krystaliczne, często stanowiące solwaty, do identyfikacji których wykorzystano DSC [61]. Podobnie, badano formy krystaliczne famotydyny uzyskane w wyniku dodania do niej wody w różnych proporcjach oraz uzyskane podczas mielenia famotydyny w warunkach różnej

wilgotności [62]. Badano też skuteczność procesu otrzymywania bezwodnej trehalozy z użyciem bezwodnego etanolu [63].

Wilgoć zawarta w amorficznej substancji przeznaczonej do celów farmaceutycznych powoduje jej uplastycznienie i obniżenie temperatury przemiany szklistej [58,64]. Jest to istotne z punktu widzenia właściwości technologicznych składników leku. Oznaczenia wilgotności substancji amorficznej można dokonać wykorzystując prawo Gordona i Taylora. Przedstawia ono zależność temperatury przemiany szklistej ($T_{g_{mixt}}$) od udziału masowego wilgoci i substancji badanej (w_1 i w_2) z uwzględnieniem temperatury przemiany szklistej tej substancji i wody (T_{g_1} i T_{g_2}). Parametr k stanowi wartość stałą dla badanej pary substancji i uwzględnia temperatury zeszklenia oraz gęstości czystych składników (ρ_1 i ρ_2):

$$T_{g_{mixt}} = \frac{w_1 T_{g_1} + k w_2 T_{g_2}}{w_1 + k w_2}$$

$$k = \frac{\rho_1 \times T_{g_1}}{\rho_2 \times T_{g_2}}$$

Wykorzystując tą zależność oznaczano wilgotność, która wpływa na plastyczność Eudragitu RLPO [58]. Próbki przechowywano w warunkach o różnej wilgotności. Dodatkowo, oznaczono całkowitą zawartość wilgoci metodą Karla-Fishera. Badanie zawartości wody w zależności od warunków przechowywania z wykorzystaniem DSC o modulowanej temperaturze przeprowadzono również dla próbek sakwinawiru [65] i siarczanu salbutamolu [66], otrzymanego metodą mielenia i suszenia rozpyłowego.

DSC pozwala również na ocenę zawartości wody w mieszaninach substancji przeznaczonych do celów farmaceutycznych. Przykładem jest oznaczenie wody krystalizacyjnej w mikrosferach składających się z węglanu wapnia i alginianów [67]. Na krzywych DSC widoczny jest pik endotermiczny związany z dehydratacją dwuwodnego węglanu wapnia. Badano też mieszaniny zoniporidu z sacharozą i dodatkiem różnych ilości sorbitolu w celu ustalenia proporcji składników, umożliwiającej otrzymanie liofilizatu o jak najmniejszej wilgotności [68].

Do oceny zawartości wilgoci w substancjach przeznaczonych do celów farmaceutycznych wykorzystać można również metody spektroskopii IR. Szczególnie użyteczna jest FTIR, ponieważ w widmach rejestrowanych tą metodą bardzo wyraźnie zaznaczają się pasma absorpcyjne silnie polarnych wiązań cząsteczek wody, co zwykle zakłóca wynik pomiaru. Intensywność sygnałów zależy też od zawartości wilgoci w próbce. Zjawisko to wykorzystano do oznaczenia wilgoci i oceny procesów suszenia i dehydratacji penicyliny G [69].

2.5 Trwałość

Badanie trwałości zalecane przez ICH dotyczy chemicznej i fizycznej niezmienności substancji. Należy je prowadzić przez co najmniej 6 miesięcy przed aplikacją rejestracyjną i dodatkowo przez okres wymagany dla danej substancji, w temp. $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ lub $30\pm 2^{\circ}\text{C}$ i odpowiednio $60\pm 5\%$ lub $65\pm 5\%$ wilgotności względnej. Analiza powinna być prowadzona co 3 miesiące w pierwszym roku badania, co 6 miesięcy w drugim i raz do roku w kolejnych latach. W warunkach przyspieszonego starzenia próbki przechowuje się przez 6 miesięcy w temp. $40\pm 2^{\circ}\text{C}$ i wilgotności $75\pm 5\%$. Wymagane jest wykonanie co najmniej trzech analiz, w tym zawsze na początku i na końcu badania. Na podstawie wyników wyznacza się okres trwałości substancji i ustala warunki przechowywania dla kolejnych serii produkcyjnych.

Do badania trwałości substancji przeznaczonych do celów farmaceutycznych wykorzystuje się wiele metod analitycznych, w tym metody chromatograficzne. Użyteczne są również metody analizy termicznej, w szczególności DSC, ponieważ rozkład substancji czynnej, krystalizacja postaci amorficznej lub przemiany polimorficzne, widoczne są na krzywych DSC. Zmiany te mogą powodować różnice intensywności lub przesunięcie piku topnienia. Mogą też pojawiać się nowe piki nie obserwowane na krzywych DSC substancji wyjściowej lub referencyjnej.

W badaniu trwałości chemicznej substancji równie użyteczne są metody spektroskopii IR i Ramana, ponieważ niewielkie zmiany w składzie próbki, wynikające z utworzenia produktów rozpadu lub cyklizacji, powodują przesunięcie lub zanik pasm w widmie badanej substancji lub pojawienie nowych pasm. W literaturze można znaleźć liczne przykłady zastosowania tych metod w badaniu trwałości substancji. Przykładem jest ocena stabilności chemicznej gabapentyny, która ulega niekorzystnemu procesowi laktamizacji [70]. Metody DSC i FTIR wykorzystano do badania produktów rozpadu substancji czynnej. Badano również trwałość chlorowodoru ranitydyny i tabletek zawierających tą substancję, a ponadto famotydyny oraz cymetydyny w warunkach przyspieszonego starzenia [71]. Trwałość substancji badano metodami DSC, FTIR, NIR i spektroskopii Ramana.

W badaniu trwałości substancji przeznaczonych do celów farmaceutycznych za pomocą testów przyspieszonego starzenia wykorzystuje się również techniki sprzężone, np FTIR i DSC. W ten sposób badano trwałość półwodnego aspartamu, dwuwodnego lizynoprilu oraz maleinianu enalaprilu i jego mieszanin z Eudragitem E [72]. Pomiary FTIR prowadzono w warunkach liniowo wzrastającej temperatury, a ocena trwałości obejmowała identyfikację produktów rozkładu tworzących się w następstwie cyklizacji substancji.

W procesach technologicznych bardzo ważny jest aspekt fizycznej trwałości postaci amorficznej, formy krystalicznej oraz niezmiennosc formy solwatowanej. Jest to szczególnie istotne ze względu na często występujące zjawisko krystalizacji form amorficznych lub rekrytalizacji form polimorficznych pod wpływem podwyższonej wilgotności i temperatury. DSC jest użyteczna w kontroli trwałości tych form, ponieważ zapewnia łatwą i szybką identyfikację przemiany szklistej formy amorficznej substancji czynnej oraz jej rekrytalizacji. Przykładem wykorzystania DSC jest ocena trwałości formy amorficznej glibenklamidu przechowywanego w temp. 60°C i 0% wilgotności [73]. Badano też stabilność krystalicznych form epoksydowanych pochodnych cholesterolu, które przechowywano w warunkach zalecanych przez ICH dla testów trwałości substancji [74]. Podobnie, badano wpływ różnych sposobów otrzymywania na amorficzność karwedilolu oraz trwałość tej formy podczas przechowywania substancji czynnej w warunkach przyspieszonego starzenia [75]. Badano również trwałość kapsulek żelatynowych miękkich przechowywanych w warunkach wilgotności 33 i 75% i temp. 4, 26 i 37°C [76].

Na trwałość formy amorficznej lub krystalicznej wywierają wpływ również substancje pomocnicze. Poszukiwane są kompozycje substancji, które hamują krystalizację lub rekrytalizację, co potwierdza się zwykle badając mieszaniny przechowywane w warunkach stresowych. Przykładem użyteczności DSC w tym zakresie jest poszukiwanie substancji zwiększających trwałość formy amorficznej cynaryzyny, którą mieszano w tym celu w różnych proporcjach z kopolimerem Soluplus oraz przechowywano w temp. 25, 40 i 60°C oraz wilgotności 0, 75 i 94% [77]. Badano również trwałość formy amorficznej indometacyny w mieszaninach fizycznych i ekstrudatach otrzymanych w procesie wytłaczania na gorąco z polimerami Soluplus i Koliidon [78]. Podobnie, korzystając z DSC, stwierdzono, że wytworzenie stałych dyspersji serycyny z lornoksykamem, meloksykamem i felodypiną, poprawia stabilność amorficznych form tych substancji leczniczych [79]. Badano trwałość enkapsulowanych flawonoidów: kwercetyny i naringeniny [80]. Próbkę przechowywano w temp. 25±2°C i wilgotności 60±5%. Oceniano skuteczność otrzymywania formy amorficznej valdekoksybu w mieszaninach fizycznych i otrzymanych w wyniku suszenia rozpyłowego z różnymi polimerami [81]. Trwałość formy amorficznej oceniano również w mieszaninach fizycznych przechowywanych w temp. 30°C i wilgotności 60%. Badano amorficzność tadalafilu w mieszaninach fizycznych oraz w substancji otrzymanej podczas jednoczesnego suszenia rozpyłowego z różnym udziałem kopolimeru winylopirolidonu z octanem winylu [82]. Oceniano również trwałość formy amorficznej tadalafilu w mieszaninach przechowywanych w temp. 25°C i wilgotności 75%, 40°C i wilgotności 0 oraz 75%, a ponadto w temp. 80 i 130°C i wilgotności 0%. Kolejny przykład to wykorzystanie DSC do

badania stabilności formy amorficznej siarczanu salbutamolu [83]. Oceniano trwałość formy amorficznej substancji czynnej w mieszaninach fizycznych i próbkach otrzymanych przez mielenie z poliwinylpirolidonem, przechowywanych w temp. ok. 22°C oraz wilgotności 15 i 75%.

Również techniki spektroskopii IR i Ramana stosowane są w badaniu wpływu substancji pomocniczych na trwałość substancji czynnej. Stosuje się też równolegle metody DSC i FTIR, jak w przypadku badania trwałości telmisartanu [84]. Badania obejmowały ocenę formy amorficznej telmisartanu w postaci stałej dyspersji z polietylenoglikolem i tlenkiem magnezu oraz w tabletkach uzyskanych z tej mieszaniny. Badano wpływ warunków przechowywania: w temp. 5-8°C oraz w temp. 25 i 40°C i wilgotności 32, 55 i 75% na trwałość formy amorficznej substancji czynnej.

DSC może być wykorzystana nie tylko do poszukiwania form substancji leczniczych, korzystniejszych pod względem trwałości, ale również w poszukiwaniu korzystnych układów nowo otrzymanych substancji leczniczych z polimerami i badaniu ich trwałości. Metodę wykorzystano w badaniu substancji oznaczanej w literaturze symbolem MK-0364, znanej pod nazwą taranabant [85,86]. Jest to nowy, odwrotny antagonist receptorów kanabinoidowych typu pierwszego. Poszukiwano korzystnego dla tej substancji układu z polimerami, pozwalającego na uzyskanie trwałej formy amorficznej substancji, z wykorzystaniem suszenia rozpyłowego i ekstruzji na gorąco. Przeprowadzono badania trwałości próbek przechowywanych w temp. 5°C z osuszaczem, w temp. 25 i 40 i 60°C bez kontroli wilgotności, w temp. 30°C i wilgotności 65% oraz w temp. 40% i wilgotności 75%. Wykorzystując DSC stwierdzono, że spośród badanych polimerów, kopowidon najskuteczniej hamuje krystalizację amorficznej formy taranabantu.

DSC wykorzystuje się ponadto, zwykle w równocześnie z termograwimetrią, w badaniu trwałości termicznej substancji. Na krzywych DSC pojawiają się bowiem piki odpowiadające przejściom fazowym: przemianom szklistym lub topnieniu oraz efektem związanym z częściowym lub całkowitym rozkładem termicznym substancji. W ten sposób badano właściwości fizyczne i trwałość termiczną pochodnych winpocetyny, zsyntezowanych jako nowe sole kwasów chlorowego(VII) i fosforowego(V), w celu uzyskania dobrze rozpuszczalnych w wodzie i trwałych pochodnych [87]. Trwałość termiczna istotna jest również w przypadku substancji białkowych, szczególnie wrażliwych na odmienne warunki temperaturowe. DSC wykorzystano w badaniu trwałości termicznej ludzkiej albuminy osoczowej po związaniu tej białkowej substancji z glukozą [88].

3 Badanie preparatów farmaceutycznych

Wysoka jakość produktu farmaceutycznego bazująca na odpowiednio dobranych składnikach, umożliwiająca prowadzenie skutecznej, bezpiecznej i wygodnej farmakoterapii jest celem pracy specjalistów zajmujących się poszukiwaniem nowych i doskonaleniem już istniejących formułacji. Jakość produktu ocenia się wykorzystując odpowiednio zaprojektowane badania. Przede wszystkim ocenia się trwałość produktu finalnego oraz potwierdza odpowiednie jego parametry aplikacyjne i fizykochemiczne. Często ocena ta obejmuje nie tylko badanie gotowego preparatu, ale również kontrolę wewnątrz- lub międzyprocesową prowadzoną w rzeczywistym czasie wytwarzania.

3.1 Interakcje

Wytworzenie produktu finalnego, który będzie charakteryzował się odpowiednią jakością wymaga prawidłowego doboru substancji leczniczych i pomocniczych popartego szczegółową analizą zgodności między składnikami. Konieczna jest znajomość interakcji między substancjami leczniczymi, jak również pomiędzy substancją czynną i substancjami pomocniczymi. Taka wiedza pozwala znacząco skrócić prace nad opracowaniem nowych formułacji. Jest to szczególnie ważne, ponieważ ilość innowacyjnych substancji leczniczych na rynku farmaceutycznym jest niewielka, natomiast poprawę skuteczności terapeutycznej upatruje się głównie w opracowaniu formułacji zapewniających lepsze właściwości farmakodynamiczne, w szczególności profil uwalniania i biodostępność. Na rynku farmaceutycznym pojawia się też coraz więcej preparatów złożonych zawierających dwie lub kilka substancji czynnych, co ma na celu uproszczenie farmakoterapii.

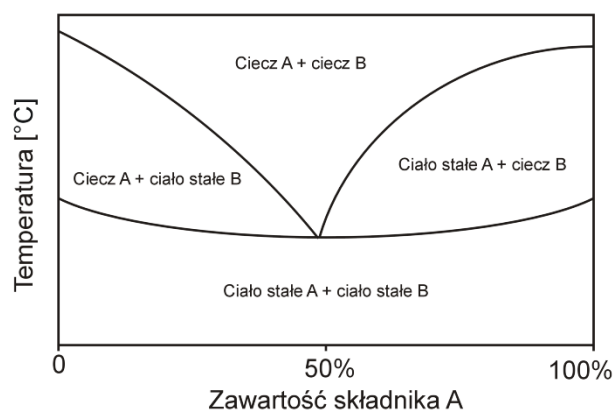
DSC jest metodą, która umożliwia szybką ocenę zgodności fizycznej i chemicznej między składnikami w fazie farmaceutycznej. Wystąpienie bowiem interakcji powoduje zmiany na krzywych DSC mieszanin substancji w porównaniu z sygnałami uzyskanymi dla poszczególnych składników, polegające na przesunięciu, poszerzeniu, zaniku lub pojawieniu się nowych pików. W większości przypadków wzajemne oddziaływanie substancji stanowią efekt niekorzystny. Do takich zwykle zalicza się tworzenie eutektyków, wzajemne rozpuszczanie składników, zmianę formy polimorficznej lub krystalizację postaci amorficznej. Niekiedy mogą jednak stanowić efekty pożądane, skutkujące poprawą stabilności, właściwości technologicznych i farmakokinetycznych substancji, np. przez tworzenie kokryształów.

Przykładem wykorzystania DSC w analizie zgodności substancji czynnych są badania mieszanin paracetamolu z kofeiną, propyfenazonem, kwasem askorbinowym i cytrynowym [89,90] oraz z chlorowodorkiem kloperastyny [91] oraz mieszanin kaptoprilu z winianem metoprololu [92]. We wszystkich wymienionych mieszaninach stwierdzono tworzenie się

eutektyku. Temperatura topnienia substancji czynnej w mieszaninach zależy jest od udziału składników i warunków przygotowania mieszaniny. Jeśli tworzenie eutektyku nie wpływa niekorzystnie na właściwości fizykochemiczne produktu finalnego, nie jest postrzegana jako zjawisko negatywne, jak np. w mieszaninie kofeiny z paracetamolem [89]. Temperatura topnienia tego eutektyku jest znacznie wyższa od temperatur występujących w trakcie procesu produkcyjnego, stąd na rynku farmaceutycznym znajdują się preparaty zawierające obie te substancje. Wytworzenie mieszaniny eutektycznej może stanowić efekt pożądany, jak w mieszaninie ibuprofenu z terpenami [93]. Obniżenie temperatury topnienia substancji po ich wymieszaniu powoduje lepsze przenikanie ibuprofenu przez skórę. Kolejnym przykładem wykorzystania DSC w badaniu interakcji pomiędzy substancjami leczniczymi jest ocena zgodności pomiędzy ampicyliną i dikloksacyliną, których łączne stosowanie jest bardzo korzystne terapeutycznie ze względu na synergizm hiperaddycyjny w działaniu przeciwbakteryjnym [94].

W procesie technologicznym i terapeutycznym istotne są również oddziaływania pomiędzy substancjami leczniczymi oraz pomocniczymi. Badania zgodności przeprowadzone na wstępnym etapie projektowania postaci leku pozwalają znacząco skrócić i uprościć proces formulacji. Liczne są przykłady wykorzystania DSC w takich obszarach, jak badanie zgodności pomiędzy kwasem acetylosalicylowym [95], hydrokortyzonem [96], monoazotanem izosorbidu [97], meloksykamem [98], kofeiną [99] i glipizydem [100], a wybranymi substancjami pomocniczymi. Badano też zgodność kurkuminy w formie nanocząstek z żelatyną [43]. Przykładem wykorzystania DSC, jest badanie trwałości formy krystalicznej karbamazepiny po utworzeniu stałych dyspersji z Kollidonem VA64 oraz Neusulinem UFL2, dodanych w różnych proporcjach [101]. Do badania niezgodności wykorzystywana jest również DSC o wysokiej czułości (*High-Sensitivity Differential Scanning Calorimetry* - HSDSC), dzięki której zauważyć można interakcje zachodzące wolno lub powodujące niewielkie zmiany efektu termicznego [102].

W oparciu o wyniki uzyskane za pomocą DSC można też opracować diagramy fazowe, ułatwiające interpretację oddziaływań między składnikami [90,91,92,93]. Diagramy te są wykresami przedstawiającymi układ fazowy w mieszaninie dwu- lub trójskładnikowej, w zależności od temperatury. Schemat diagramu fazowego dla mieszaniny dwuskładnikowej przedstawia Rys. 4.



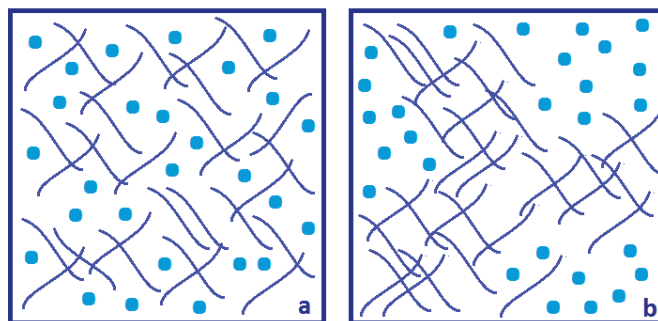
Rys. 4. Modelowy diagram fazowy dla mieszaniny dwuskładnikowej (A+B).

Na podstawie temperatury i entalpii przemian fazowych opracowuje się diagramy obrazujące stany skupienia współistniejące w różnych warunkach temperatury, zależnie od udziału składników [90]. Wykorzystuje się w tym celu funkcję energii swobodnej Gibbsa, opierającej się na energii wewnętrznej układu. Umożliwia to szczegółowe badanie wpływu procesu mieszania substancji na ich właściwości fizyczne, m.in. na zdolność do tworzenia eutektyków wraz z dokładną oceną ilościową tego procesu.

Zgodność między składnikami mieszanin ocenić można również korzystając z metod spektroskopowych FTIR i Ramana. Jeśli w widmach mieszanin występują wszystkie pasma charakterystyczne dla poszczególnych substancji, to składniki uważa się za zgodne [91,92,93]. Badanie mieszanin o różnym składzie umożliwia wykrycie niezgodności zależnych od stężenia. Metody te umożliwiają nie tylko detekcję interakcji, ale również wyjaśnienie ich charakteru, ponieważ obrazują wiązania chemiczne, jakie występują w badanych substancjach oraz oddziaływania między składnikami w mieszaninach. Przykładem takiego wykorzystania metod jest badanie zgodności składników opatrunków specjalistycznych z chlorowodorkiem gatifloksacyny [103]. Badano zgodność lamiwudyny [104], diklofenaku sodu [105] i glipizydu [106] z substancjami pomocniczymi wybranymi do opracowania składu tabletek o modyfikowanym uwalnianiu. Badano zgodność glimepirydu z polimerami Soluplus i polietylenoglikolem (*Polyethylene glycol* - PEG) 4000 [107], atorwastatyny w postaci stałej dyspersji z poliwinylpirolidonem (*Polyvinylpyrrolidone* - PVP) K30 [108]. Badania miały na celu opracowanie formulacji o korzystnych parametrach farmakokinetycznych.

Szczególnym rodzajem interakcji między składnikami jest ich zdolność do mieszania się [109,110]. Właściwość, dawniej rozpatrywana wyłącznie w fazie ciekłej, obecnie ma znaczenie również w fazie stałej. Oznacza ona możliwość uzyskania mieszaniny o homogennym rozproszeniu cząstek, jak przedstawiono na Rys. 5a. Jeśli składniki słabo się ze sobą mieszają,

występuje tendencja do grupowania się cząstek poszczególnych substancji, jak przedstawiono na Rys. 5b.



Rys. 5. Rozproszenie cząsteczek substancji w mieszaninie substancji stałych
a) mieszających się ze sobą i b) niemieszających się.

Do oceny wzajemnego mieszania się substancji sproszkowanych może być wykorzystana DSC. Jeśli substancje amorficzne dobrze się ze sobą mieszają tworząc w fazie stałej dyspersję cząsteczkową, na krzywej DSC pojawia się jeden sygnał przemiany szklistej, jeśli zaś składniki pozostają częściowo rozdzielone sygnały są dwa lub kilka. Zastosowanie DSC o modulowanej temperaturze pozwala na lepsze rozdzielenie sygnałów przemian szklistych, których temperatury są bardzo zbliżone. Zjawisko mieszania się substancji często zależne jest od udziału procentowego poszczególnych składników, wpływa na trwałość formy amorficznej i rozpuszczalność substancji czynnej.

Jeśli substancja czynna w postaci krystalicznej dobrze miesza się z substancją pomocniczą, następuje obniżenie temperatury topnienia substancji czynnej, zaś jeśli substancje mieszają się słabo, temperatura topnienia się nie zmienia lub obniża nieznacznie. Korzystając z parametru Florrego-Huginsa (χ), można ilościowo interpretować te zjawiska:

$$\frac{1}{T_{mix}} - \frac{1}{T_{pure}} = -\frac{R}{\Delta H_{fus}} \left[\ln \phi_{API} + \left(1 - \frac{1}{m}\right) \phi_{polimer} + \chi \phi_{polimer} \right]$$

gdzie: T_{mix} i T_{pure} stanowią odpowiednio temperatury topnienia mieszaniny i substancji czynnej, ϕ_{API} i $\phi_{polimer}$ - frakcje objętościowe składników, ΔH_{fus} - entalpię topnienia, zaś m to stosunek ilości substancji aktywnej do polimeru.

Jeśli wartość parametru χ jest dodatnia, składniki można uznać za słabo- lub niemieszające się. Jeżeli natomiast wartość χ jest ujemna, składniki dobrze się mieszają. Wiąże się to z obniżeniem aktywności termodynamicznej układu, co zmniejsza prawdopodobieństwo krystalizacji formy amorficznej i jest związane z częściowym rozpuszczeniem substancji czynnej w polimerze. Taką właściwość stwierdzono w mieszaninie nifedypiny i felodypiny z PVP [110].

Do oszacowania wzajemnego mieszania indometacyny i lowastatyny z alginianami wykorzystano natomiast parametry rozpuszczalności Hansena (δ) [111].

Analiza termiczna w badaniu mieszanin składników jest często wspomagana metodami spektroskopowymi z zakresu podczerwieni [109,112,113]. Szczególnie użyteczne jest mapowanie Ramanowskie lub jego modyfikacja w skali mikro, która umożliwia ocenę jednolitości rozmieszczenia poszczególnych składników w mieszaninach. Analiza wyników badań zgodności bywa również wspomagana wielowymiarową analizą danych [96,99].

3.2 Kokryształy

Jednym ze sposobów modyfikacji rozpuszczalności, poprawy biodostępności i stabilności substancji leczniczych jest tworzenie kryształów złożonych. W kokryształach substancje połączone są niekowalencyjnymi wiązaniami, zwykle wodorowymi. Mogą być one zbudowane z dwóch lub kilku substancji czynnych, lub z substancji czynnych i pomocniczych. Tworzenie kokryształów stanowi dobrą alternatywę dla tworzenia soli, szczególnie w przypadku substancji o bardzo słabych właściwościach kwasowo-zasadowych. DSC jest użyteczna już na etapie tworzenia kokryształów, ponieważ umożliwia poznanie mechanizmu ich powstawania.

Formowanie kryształów złożonych w fazie stałej może bowiem przebiegać z wytworzeniem mieszaniny eutektycznej lub w wyniku wzajemnego rozpuszczania składników [114,115]. DSC jest szeroko wykorzystywana do charakteryzowania formy fizycznej kryształów złożonych i ich stabilności. W ten sposób badano m.in. kokryształy ibuprofenu, furosemidu, gryzeofluwiny, benzokainy, indometacyny i sulfapirydiny z włóknami jota-karagenu [116]. Podobnie badano kokryształy benzodiazepin (chlordiazepoksydu, klonazepamu, diazepam, estazolamu, lorazepamu, lormetazepamu, oxazepamu i temazepamu) z kofeiną, nikotynamidem oraz kwasami p-aminobenzoowym, fumarowym, glutarowym i bursztynowym [117]. Zrozumienie interakcji pomiędzy składnikami współtworzącymi kryształy złożone często jest ułatwione dzięki zastosowaniu metod spektroskopii IR i Ramana. Przykładem równoległego wykorzystania DSC i metod spektroskopowych jest badanie kokryształów diflunisalu z nikotynamidem [118], furosemidu z kofeiną [119], itrakonazolu z aminokwasami i kwasem bursztynowym [114], furosemidu z adeniną [115] oraz felodypiny z kwasem glutarowym [120]. DSC zastosowano do oceny formy krystalicznej, zaś FTIR do badania interakcji, jaka zaistniała pomiędzy składnikami i ustalenia grup funkcyjnych uczestniczących w tworzeniu wiązań między cząsteczkami.

Kokryształy mogą stanowić też formę trwalszą termicznie w porównaniu z mieszaniną fizyczną składników. Takie zjawisko stwierdzono wykorzystując DSC do badania kryształów

złożonych nikotynamidu z ibuprofenem, zaś do szczegółowej oceny oddziaływań między składnikami wykorzystano spektroskopię Ramana i FTIR [121]. Podobnie wykorzystano DSC i FTIR do badania kokryształów izoniazydu z kwasami p-nitrobenzoesowym, p-cyjanobenzoowym i p-aminobenzoowym [122], sulfaguanydiny z kwasem tiobarbiturowym i 1,10-fenantroliną [123] oraz febuksostatu z izonikotynamidem i arginina [124]. Dodatkowo, spektroskopię z zakresu bliskiej podczerwieni (NIR) wykorzystuje się również do badania procesu krystalizacji w czasie rzeczywistym technologii analizy procesu (*Process Analytical Technology - PAT*) [115].

3.3 Preparaty gotowe i formy pośrednie do ich wytworzenia

Badania potwierdzające jakość i zgodność pomiędzy substancjami przeznaczonymi do celów farmaceutycznych mają na celu ułatwienie i przyspieszenie procesu tworzenia gotowych postaci leku. Finalna postać leku wymaga często wytworzenia w pierwszej kolejności produktów, które stanowią pośredni etap w produkcji leku, np. granulatów, peletek, mikrosfer. Zarówno produkt końcowy jak i produkty pośrednie muszą być kontrolowane pod względem jakości, co ma zapewnić możliwie wysoki komfort i bezpieczeństwo farmakoterapii. Wachlarz analizowanych parametrów i wykorzystywanych w tym celu metod analitycznych jest bardzo szeroki. Zastosowanie znajdują również metody analizy termicznej, w szczególności DSC i metody spektroskopii IR i Ramana.

Jednym z pośrednich etapów tworzenia produktu farmaceutycznego są ekstrudaty, obecnie często wytwarzane w procesie wyłaczania na gorąco. Ze względu na możliwość uzyskania korzystnej farmakokinetycznie postaci substancji czynnej oraz jej stabilizację, ekstrudaty stają się formułą coraz bardziej popularną. Badanie ekstrudatów metodą DSC pozwala ocenić formę polimorficzną lub amorficzną substancji czynnej. W oparciu o krzywe DSC ekstrudatów tłoczonych na gorąco z kwasu acetylosalicylowego, fenofibratu oraz obu tych substancji z polimerami, w większości ekstrudatów stwierdzono zmianę formy krystalicznej substancji leczniczych na bezpostaciową i ich rozpuszczenie w matrycy [125]. W przypadku ekstrudatów tłoczonych na gorąco z krystalicznej indometacyny i kopolimerów Kollidon i Soluplus, stwierdzono prawidłowe wymieszanie składników i utworzenie amorficznej substancji czynnej [78]. Wykorzystano również metodę NIR do badania próbek w trakcie procesu ekstruzji. Do oceny jednolitości rozmieszczenia składników w ekstrudatach wykorzystano dodatkowo mapowanie Ramanowskie.

Obserwuje się też wzrost zainteresowania mikrosferami, jako postaciami leku o przedłużonym uwalnianiu substancji czynnej. Formy te zbudowane są z substancji leczniczej

zawieszanej w polimerze. DSC stosowana jest do charakteryzowania tych form leku. Na podstawie badań DSC mikrosfer zawierających imatynib lub mezylan imatynibu stwierdzono zależny od ilości substancji czynnej, zanik piku topnienia substancji, co wiązano z dyspersją cząsteczkową substancji czynnej w polimerze [126]. Podobnie badano mikrosfery z krystalicznym sunitynibem, bazujące na kopolimerach o różnym procentowym udziale składników [127]. Z kolei mikrosfery zawierające aksetyl cefuroksymu i kwas stearynowy, poddano działaniu buforów o różnym pH [128]. Wykorzystując DSC oraz HSDSC stwierdzono krystaliczność prilokainy, a następnie jej zgodność z polimerami, za pomocą których enkapsulowano substancję czynną [129]. Podobnie przy pomocy DSC stwierdzono krystaliczność fitosteloli, które enkapsulowano za pomocą różnych polimerów [130].

W technologii farmaceutycznej istotne jest również znaczenie liofilizatów, które umożliwiają uzyskanie jednolitych, trwałych dyspersji kilku substancji, szczególnie użytecznych w przypadku składników nietrwałych w obecności wody, np. substancji białkowych. DSC może być wykorzystana do opracowania warunków ich otrzymania, ponieważ prowadzenie liofilizacji w temperaturze niższej niż temperatura przemian szklistych stosowanych substancji zwiększa trwałość utworzonych formulacji [131]. Można też badać zgodność substancji użytych w procesie wytwarzania z substancją czynną. Przykładem badania DSC liofilizowanych liposomów z jopomidem [132] czy nanocząstek protaminy z chondroityną jako nośników kalcytoniny łososiowej [133]. Oddziaływania pomiędzy składnikami analizowano również w oparciu o wyniki uzyskane metodą FTIR.

Szeroko wykorzystywane jako forma gotowa, lub do sporządzenia innych postaci leku, są również peletki. Wykorzystanie stałej dyspersji substancji czynnej w polimerze i jej peletkowanie stanowi kolejną postać leku, która umożliwia zwiększenie rozpuszczalności niektórych substancji leczniczych. DSC może być wykorzystana do oceny zgodności składników rdzenia peletek lub otoczki z substancją czynną. Przykładem są badania DSC mieszanin ketoprofenu z różnymi matrycami w formie stałych dyspersji opracowanych jako mieszaniny do wytworzenia peletek [134]. Badano również gotowe peletki powlekane otoczkami zawierającymi chlorowoderek diltiazemu na bazie różnych polimerów [135]. Oceniano wpływ procesu peletkowania w różnych warunkach na trwałość postaci amorficznej i form polimorficznych diltiazemu. W celu zbadania zgodności użytych składników, rozszerzono charakterystykę termiczną próbek o wyniki FTIR.

DSC wraz ze spektroskopią FTIR wykorzystującą osłabione całkowite odbicie (*Attenuated Total Reflection* – ATR) zastosowano do badania różnych nanoform, w celu opracowania możliwie najkorzystniejszych układów do wytworzenia suchej inhalacji proszkowej (*Dry Powder Inhaler* - DPI) z wodorowinianem riwastygminy [136]. Przy pomocy DSC i MT-DSC określono

formy polimorficzne siarczanu salbutamolu i cyklezonidu przeznaczone do wytworzenia proszku do inhalacji [137]. Następnie oceniono skuteczność utworzenia amorficznych postaci tych substancji podczas otrzymywania proszku do inhalacji metodą mielenia i suszenia rozpyłowego. Podobnie, wykorzystując DSC potwierdzono krystaliczność riwastygminy oraz utworzenie formy amorficznej tej substancji po sporządzeniu z niej nanocząstek, przeznaczonych do podania donosowego [138]. Badania prowadzono w ramach programu zapewnienia jakości przez prawidłowe zaprojektowanie procesów technologicznych (*Quality by Design* – QbD).

W badaniu tabletek i mieszanin składników przeznaczonych do ich otrzymania, szczególnie w procesie opracowywania nowych formułacji, DSC często jest stosowana równoległe ze spektroskopią FTIR i Ramana. DSC i FTIR wykorzystano do badania zgodności lewofloksacyny ze składnikami mieszanin tabletkowych dodanymi w celu uzyskania tabletek pęczniejących w żołądku [139]. Podobnie, badano zgodność między składnikami mieszanin do sporządzenia tabletek z tiabendazolem [140], lamiwudyną [104] i glipizydem [106].

3.4 Analiza ilościowa

Zgodność dawki substancji leczniczej z wartością deklarowaną przez producenta podlega ścisłym kryteriom odchyień, zależnym od gramatury substancji leczniczej w porcji leku. Substancje czynne oznacza się metodami wskazanymi przez obowiązujące farmakopee dla konkretnej substancji czynnej i niekiedy postaci leku. Często są to metody miareczkowe, również w środowisku niewodnym, metody spektroskopowe, szczególnie z zakresu ultrafioletu i widzialnego (*Ultraviolet-visible* - UV-Vis) oraz chromatograficzne. Korzysta się również z innych, odpowiednio zwalidowanych metod.

Zastosowanie w analizie ilościowej znajduje również DSC. Entalpia przemian fazowych, zachodzących w funkcji temperatury jest proporcjonalne do zawartości substancji czynnej. Dzięki temu możliwe jest wyznaczenie liniowej zależności pomiędzy entalpią procesu termicznego a składem próbki. Krzywą kalibracji opracowuje się zwykle korzystając z entalpii topnienia substancji oznaczanej [141]. Zależność tą wykorzystano do oznaczenia diklofenaku w tabletkach oraz po przeprowadzeniu soli sodowej w postać kwasową, również w czopkach i ampułkach [142].

Oznaczenie substancji czynnej w mieszaninie z substancjami pomocniczymi za pomocą DSC jest możliwe, jeśli nie zachodzi niezgodność między składnikami, a piki topnienia są całkowicie rozdzielone. Jeśli proces topnienia przebiega z równoczesnym rozkładem, możliwe jest przeprowadzenie dekonwolucji [143]. Polega ona na rozdzieleniu na krzywej DSC pików związanych z topnieniem oraz z degradacją. Detekcja temperatury, w której inicjowany jest rozkład substancji możliwa jest dzięki przeprowadzeniu badań TG w tych samych warunkach, w

jakich prowadzone są badania DSC. W ten sposób, po rozdzieleniu efektów termicznych, znaleziono liniową zależność entalpii topnienia od zawartości kwasu acetylosalicylowego w próbce oraz oznaczono substancję czynną w dwóch preparatach farmaceutycznych. Uzyskane wyniki były bardzo zbliżone do wartości deklarowanych przez producenta oraz zgodne z wynikami otrzymanymi za pomocą zalecanych przez farmakopee metod spektrometrycznych i miareczkowych. Oznaczając prilokainę w postaci enkapsulowanej, uzyskano liniową zależność entalpii topnienia od logarytmu naturalnego zawartości substancji czynnej w formulacji [129]. Metodą DSC oznaczono również frakcje molowe testosteronu, octanu tokoferolu oraz kwasu retinowego zamkniętych we wnętrzu liposomów [144]. Oznaczenie oparto na równaniu Van't Hoffa przekształconym do postaci:

$$X = \frac{\Delta H(T_0 - T_m)}{RT_0^2}$$

W równaniu X oznacza frakcję molową substancji zawartej pomiędzy podwójną warstwą lipoproteinową, ΔH i T_0 - entalpię i temperaturę przemiany termicznej, T_m - temperaturę topnienia liposomów z substancją lipofilową, R – stałą gazową.

DSC wykorzystano również do określenia proporcji składników, w jakich tworzą się eutektyki pomiędzy paracetamolem oraz propyfenazonem i kofeiną [89]. Utworzenie eutektyku zależne jest od składu tabletki i siły nacisku stępla tabletkarki, która decyduje o powierzchni kontaktu pomiędzy składnikami formulacji. DSC przydatna jest również do oznaczenia proporcji, w jakiej poszczególne formy polimorficzne nimodypiny występują w substancji do celów farmaceutycznych [145].

W analizie farmaceutycznej wykorzystywane są równoległe metody termiczne i spektroskopowe. Korzystając z DSC i FTIR oznaczono formę polimorficzną β -mezylanu imatynibu w mieszaninie z formą α [141]. Przeprowadzono też kalibrację metod FTIR, spektroskopii Ramana i DSC do oznaczenia składników tworzących kokryształy nikotynamidu z ibuprofenem [121]. Analiza danych wskazała na wysoką spójność wyników z wartościami obliczonymi teoretycznie.

CEL PRACY

Ocena jakości substancji i produktów leczniczych jest zagadnieniem bardzo ważnym. Ustawodawstwo farmaceutyczne przewiduje kontrolę zgodności substancji czynnych, substancji pomocniczych i produktów leczniczych z ustalonymi dla nich normami. Zobowiązuje to producentów do sprawdzania jakości surowców użytych do produkcji preparatów farmaceutycznych oraz do prowadzenia kontroli zarówno procesu produkcyjnego jak i produktu finalnego. Do prawidłowej realizacji tych zadań konieczne jest użycie odpowiednich technik analizy instrumentalnej. Doniesienia literaturowe z ostatnich lat wskazują na duże zainteresowanie wykorzystaniem w tym celu różnicowej kalorymetrii skaningowej (DSC) i termograwimetrii (TG). Biorąc powyższe pod uwagę, celem badań było wykazanie, w jakim zakresie technika DSC może być wykorzystana do analizy składu handlowych preparatów farmaceutycznych. Cel główny realizowano poprzez cele cząstkowe:

- określenie możliwości wykorzystania DSC do badań identyfikacyjnych (potwierdzenia tożsamości) substancji leczniczych i substancji pomocniczych stosowanych w przemyśle farmaceutycznym,
- zbadanie możliwości identyfikacji składu handlowych produktów leczniczych, tj. wykorzystania DSC do potwierdzenia obecności składnika lub składników w preparacie (potwierdzenie obecności konkretnej substancji w produkcie leczniczym, zawierającym obok substancji czynnej kilka substancji pomocniczych),
- określenie przydatności DSC do analizy ilościowej produktów leczniczych różniących się zawartością określonej substancji czynnej oraz rodzajem i zawartością substancji pomocniczych (preparaty zawierające tę samą substancję czynną, ale wytwarzane przez różnych producentów).

W efekcie badań przeprowadzonych nad grupą substancji i handlowych produktów leczniczych techniką DSC spodziewane jest opracowanie nowych procedur analizy ilościowej badanych substancji leczniczych w zawierających je handlowych preparatach farmaceutycznych. Weryfikacja wiarygodności uzyskanych wyników prowadzona będzie na podstawie parametrów walidacyjnych. Oczekuje się, że nowo opracowane metody analityczne będą posiadały przewagę nad metodami proponowanymi przez Farmakopeę Polską, m.in. okażą się bardziej dokładne i precyzyjne, szybsze w wykonaniu, tańsze, a ponadto nie będą wymagały specjalnego przygotowania próbki do analizy oraz użycia rozpuszczalników i odczynników chemicznych, co zgodne jest z zasadami tzw. zielonej chemii (Green Chemistry). Być może będą użyteczne w technologii analitycznej kontroli pośrednich etapów procesu wytwarzania farmaceutycznego produktu handlowego.

W celu głębszego zrozumienia charakteru zjawisk zachodzących pomiędzy składnikami preparatów wykorzystywanymi w trakcie badań, zakres metod analitycznych rozszerzono o metody spektroskopowe FTIR i Ramana. Miało to na celu szczegółową analizę ewentualnych oddziaływań pomiędzy substancjami leczniczymi i pomocniczymi, na płaszczyźnie chemicznej oraz fizycznej. Ponadto, dla lepszego zrozumienia tych relacji, wykorzystano obserwację termomikroskopową oraz opracowano diagramy fazowe, obrazujące stan równowagi fazowej dla dwuskładnikowych mieszanin w fazie stałej.

CZEŚĆ EKSPERYMENTALNA

1. Materiały do badań

Substancje lecznicze i pomocnicze

W badaniach wykorzystano następujące substancje lecznicze i pomocnicze: kwas acetylosalicylowy (ASA) (Polpharma, Starogard Gdański); paracetamol (PAR; $\geq 99\%$), kofeinę (KOF), teofilinę (TF), hydroksypropylometylocelulozę (HPMC, hypromelozę; $\geq 99\%$) (Sigma-Aldrich, Steinheim, Niemcy); tlenek glinu (POCH, Gliwice); etylocelulozę (MP Biomedicals LLC, Illkirch Cedex, Francja); metylocelulozę (Shin-Etsu Chemical Co., Tokio, Japonia); celulozę mikrokryształiczną (FMC BioPolimer, Bruksela, Belgia); poliwinylpirolidon (PVP, powidon K-25) (Fluka, Poznań); laktozę (PPH Galfarm, Kraków); stearynian magnezu (Sinochem, Jiangsu, Chiny); skrobię ziemniaczaną (Sigma-Aldrich, Steinheim, Niemcy); sacharozę (Pharma Cosmetics, Kraków).

Preparaty farmaceutyczne

Preparaty farmaceutyczne badane w ramach pracy doktorskiej zestawiono w Tabelach 1-4. Skrót d.w. oznacza datę ważności.

Tabela 1. Preparaty handlowe zawierające PAR.

Nazwa handlowa	Postać leku	Dawka leku [g]	Średnia masa tabletki [g]	Zawartość PAR w tabletkce [%]	Podmiot odpowiedzialny, seria i data ważności
Apap	tabletki powlekane	0,5000	0,5599	89,30	US Pharmacia nr serii: U2700257 d.w.: 12.2020
Panadol	tabletki powlekane	0,5000	0,5929	84,33	GlaxoSmithKline nr serii: FS4M d.w.: 11.2020
Paracetamol Polfa Łódź	tabletki	0,5000	0,7978	62,67	Laboratoria Polfa Łódź nr serii:602083 d.w.: 12.2019
Paracetamol Apteomed	tabletki	0,5000	0,8126	61,53	Synoptis Pharma nr serii:601176 d.w.: 06.2019

Tabela 2. Preparaty handlowe zawierające ASA.

Nazwa handlowa	Postać leku	Dawka leku [g]	Średnia masa tabletki [g]	Zawartość ASA w tabletkce [%]	Podmiot odpowiedzialny, seria i data ważności
Polopiryna S	tabletki	0,3	0,5006	59,93	Polpharma nr serii: 50216 d.w.: 02.2018
Aspirin Pro	tabletki powlekane	0,5	0,6712	74,50	Bayer nr serii: BTAG781 d.w.:05.2018
Acard	tabletki dojelitowe	0,15	0,2211	67,84	Polfa Warszawa nr serii: 05PD1016 d.w.: 10.2018
Polocard	tabletki powlekane	0,15	0,2155	69,61	Pfizer nr serii: C2A007A d.w.: 08.2020

Tabela 3. Preparaty handlowe zawierające TF oraz pochodne celulozy jako substancje pomocnicze.

Nazwa handlowa	Postać leku	Dawka leku [g]	Średnia masa tabletki [g]	Zawartość TF w tabletkce [%]	Podmiot odpowiedzialny, seria i data ważności
Theospirex retard 150	tabletki o przedłużonym uwalnianiu	0,15	0,1808	82,96	Biofarm nr serii: 070607 d.w.: 06.2010
Theospirex retard 300	tabletki o przedłużonym działaniu	0,3	0,3590	83,56	Biofarm nr serii: 150807 d.w.: 08.2010
Afonilum SR 375	kapsułki o przedłużonym uwalnianiu (granulat)	0,375	0,3973	94,38	Abbot nr serii: 321478D d.w.: 09.2009
Theovent 300	tabletki o przedłużonym uwalnianiu	0,3	0,5005	59,94	GlaxoSmithKline nr serii: M10020 d.w.: 10.2009

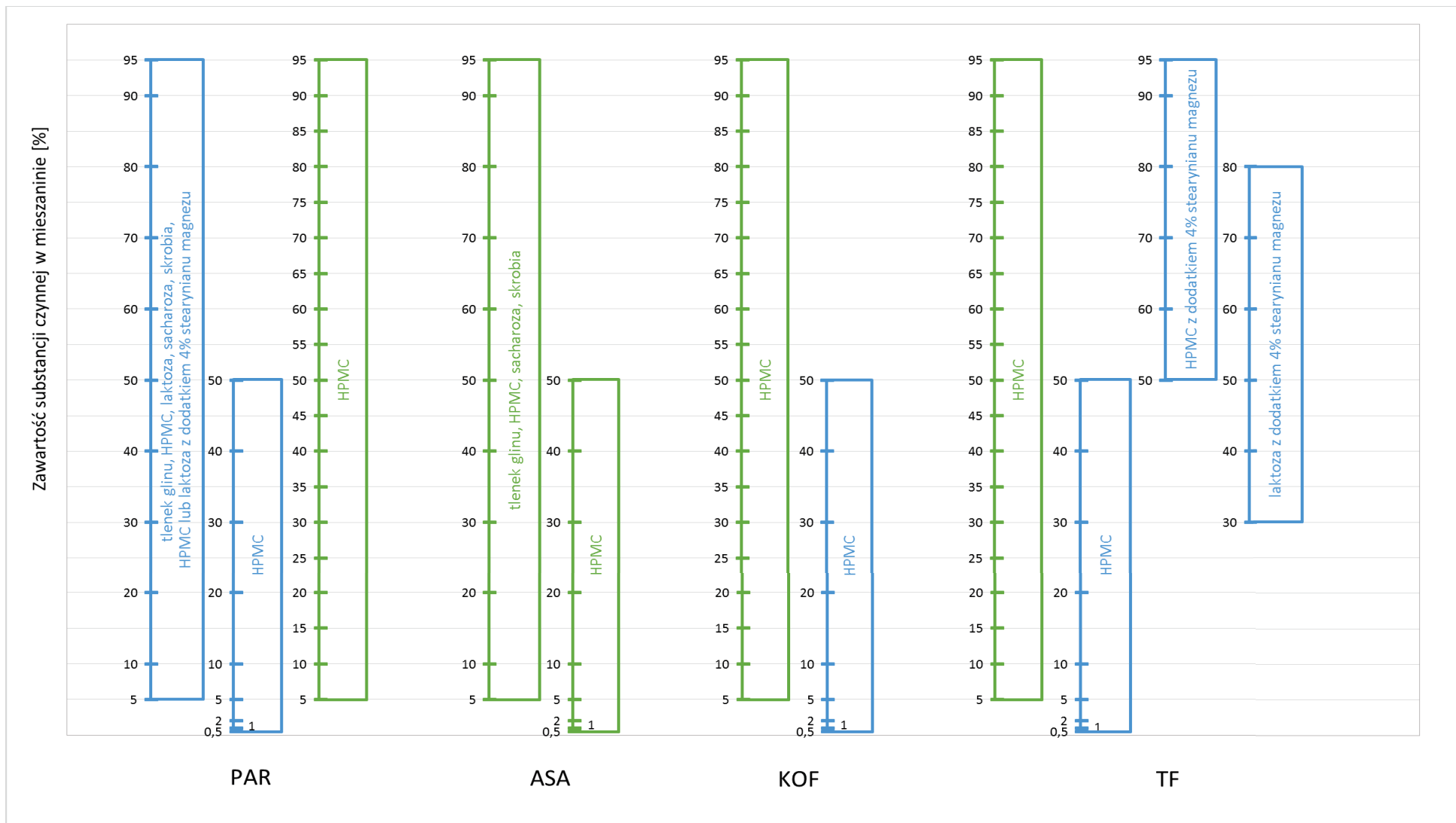
Tabela 4. Preparaty handlowe zawierające TF oraz laktozę jako substancję pomocniczą.

Nazwa handlowa	Postać leku	Dawka leku [g]	Średnia masa tabletki [g]	Zawartość TF w tabletkce [%]	Podmiot odpowiedzialny, seria i data ważności
Euphyllin CR	tabletki o przedłużonym uwalnianiu	0,25	0,5885	42,48	Altana Pharma Oranienburg nr serii: 175001 d.w.: 03.2010
Euphyllin long 200	kapsułki o zmodyfikowanym uwalnianiu (peletki)	0,2	0,2684	74,52	Altana Pharma Oranienburg nr serii: 370221 d.w.: 09.2011
Euphyllin long 300	kapsułki o zmodyfikowanym uwalnianiu (peletki)	0,3	0,4048	74,11	Altana Pharma Oranienburg nr serii: 370121 d.w.: 04.2012
Theoplus 100 mg	tabletki o przedłużonym działaniu	0,1	0,1638	61,05	Pierre Fabre Medicament nr serii: G00377 d.w.: 02.2011
Theoplus 300 mg	tabletki o przedłużonym działaniu	0,3	0,5101	58,82	Pierre Fabre Medicament nr serii: G00841 d.w.: 04.2011
Theovent 100	tabletki	0,1	0,1819	54,97	GlaxoSmithKline nr serii: M08001 d.w.: 04.2009

2. Przygotowanie próbek do badań

Realizując cel badań przygotowano wzorcowe mieszaniny tabletkowe składające się z substancji leczniczych i pomocniczych o różnym udziale substancji czynnych. Składniki odważono z dokładnością $\pm 0,1$ mg na wadze analitycznej WAA 100/X/1 (Radwag, Radom). Homogenizację prowadzono przez 10 min mieszając składniki pistlem w moździerzu porcelanowym. Podczas mieszania unikano nacisku, aby zmniejszyć prawdopodobieństwo wywołania oddziaływań międzycząsteczkowych.

W przypadku mieszanin zawierających PAR, KOF i TF z HPMC w zakresie stężeń od 5% do 95%, co 5%, homogenizację prowadzono za pomocą karty celuloidowej przez 10 min. Również w przypadku wszystkich mieszanin z ASA, homogenizację prowadzono za pomocą karty celuloidowej przez 20 min. Skład badanych mieszanin zilustrowano na Rys. 6. Kolorem niebieskim zaznaczono mieszaniny sporządzone przez homogenizację pistlem, natomiast kolorem zielonym mieszane kartą celuloidową.



Rys. 6. Graficzna ilustracja składu badanych mieszanin.

Mieszaniny z paracetamolem

Przygotowano wzorcowe mieszaniny zawierające PAR w ilości 5%, 95% oraz w przedziale od 10% do 90%, co 10%, z tlenkiem glinu, HPMC, laktozą, sacharozą, skrobią, HPMC z dodatkiem 4% stearynianu magnezu oraz laktozą z dodatkiem 4% stearynianu magnezu. Sporządzono również mieszaniny PAR z HPMC zawierające PAR w stężeniach 0,5%, 1%, 2%, 5% oraz od 10% do 50%, co 10%. Dodatkowo sporządzono mieszaniny PAR z HPMC zawierające PAR w zakresie stężeń od 5% do 95%, co 5%.

Mieszaniny z kwasem acetylosalicylowym

Przygotowano wzorcowe mieszaniny tabletkowe zawierające ASA w stężeniach 0,5%, 1%, 2%, 5% oraz od 10% do 50%, co 10%, z HPMC. Sporządzono również mieszaniny ASA z tlenkiem glinu, HPMC, sacharozą oraz skrobią, w których zawartość ASA wynosiła 5%, 95% oraz w przedziale stężeń od 10% do 90%, co 10%.

Mieszaniny z metyloksantynami

Przygotowano wzorcowe mieszaniny tabletkowe zawierające KOF lub TF w ilości 0,5%, 1%, 2%, 5% oraz w przedziale stężeń od 10% do 50%, co 10%, z HPMC. Dodatkowo sporządzono mieszaniny metyloksantyn z HPMC zawierające API w stężeniu od 5% do 95%, co 5%.

Przygotowano również mieszaniny zawierające TF w ilości 95% oraz w przedziale stężeń od 50% do 90%, co 10%, z matrycą składającą się z HPMC z dodatkiem 4% stearynianu magnezu oraz zawierające TF w ilości od 30% do 80%, co 10%, z matrycą składającą się laktozy z dodatkiem 4% stearynianu magnezu.

Preparaty farmaceutyczne

Z każdego opakowania preparatu handlowego pobrano losowo 20 jednostek leku, które zważono, a następnie zhomogenizowano przez roztarcie tabletek, peletek lub granulatu w móżdziejcu. Do oznaczeń zawartości substancji czynnej w preparatach wykorzystano technikę DSC, kalibrując procedurę analityczną metodą krzywej wzorcowej.

Kalibrację przeprowadzono w oparciu o powierzchnię lub wysokość pików DSC związanego z topnieniem substancji czynnej. Krzywe kalibracji wykreślono jako zależność entalpii topnienia od stężenia wzorca substancji czynnej.

W przypadku preparatów handlowych zawierających teofilinę wykorzystano dodatkowo kalibrację metodą wielokrotnego dodatku wzorca. Przeprowadzono badanie DSC sproszkowanego preparatu, a następnie do 0,1 g odważki tego preparatu dodano odpowiednio 0,09; 0,18 i 0,27 g TF, co stanowiło dodatek ok. 47%, 64% i 73% substancji wzorcowej i ponownie rejestrowano krzywe DSC. Wyznaczono zależność entalpii topnienia od zawartości

wzorca substancji czynnej w mieszaninie. Metodą graficzną, przez ekstrapolację krzywej wyznaczono zawartość TF w preparatach handlowych.

3. Metodyka badań

Różnicowa kalorymetria skaningowa

Krzywe DSC rejestrowano przy użyciu różnicowego kalorymetru skaningowego typu *heat flux*, model 822e (Mettler Toledo, Schwerzenbach, Szwajcaria). Badania prowadzono w atmosferze azotu przepływającego z prędkością 70 ml/min (azot badawczy o czystości 99,9996%, BOC Gazy, Gdańsk). Próbkę o masie $4,00 \pm 0,10$ mg odważono na wadze analitycznej WAA 62/X/1 (Radwag, Radom) lub na wadze XA 105 Dual Range (Mettler Toledo, Schwerzenbach, Szwajcaria) do tygli aluminiowych o poj. 40 μ l z pokrywką. W pokrywce wykonano dwa symetryczne otwory. Próbkę odniesienia stanowił pusty tygiel. Analizę wykonano ogrzewając próbkę z szybkością 10°C/min w zakresie temp. od 25°C do 300°C. W badaniach DSC przeprowadzonych z szybkim chłodzeniem, próbkę ogrzewano z szybkością 10°C/min w zakresie temp. od 25°C do 250°C, następnie utrzymywano w temp. 250°C przez 2 min, szybko chłodzono z szybkością 40°C/min w zakresie temp. od 250°C do -25°C, utrzymywano w temp. -25°C przez 2 min i ponownie ogrzewano do temp. 250°C. Do interpretacji krzywych DSC wykorzystano oprogramowanie STARe 9.10.

Kalibrację przyrządu przeprowadzono z użyciem indu (99,999%) i cynku (99,998%) (Impag AG, Postfach, Zurych). Referencyjne temperatury i entalpie topnienia dla indu i cynku wynoszą odpowiednio 156,6°C i 28,45 J/g oraz 419,6°C i 107,5 J/g, natomiast wartości zmierzone 156,6°C i 28,8 J/g oraz 420,1°C i 110,7 J/g.

Spektroskopia w podczerwieni

Widma FTIR rejestrowano za pomocą spektrometru IR z transformacją Fouriera, model Nicolet 380 FTIR, wyposażonego w detektor DTGS KBr oraz sterowanego za pomocą oprogramowania Omnic (Thermo Fisher Scientific, Madison, USA) w zakresie liczb falowych 4000-400 cm^{-1} , z rozdzielczością 4 cm^{-1} . Przed każdym pomiarem rejestrowano widmo tła, a pomiar obejmował 16 skanów. Próbkę o masie 1,0 mg homogenizowano w moździercu agatowym ze 100 mg bromku potasu do spektroskopii (Merck, Darmstadt, Niemcy) i sprasowano do postaci pastylki przy pomocy manualnej prasy hydraulicznej (Specac, Orpington, Wielka Brytania) sprzężonej z membranową pompą próżniową (KNF, Neuberger, Francja).

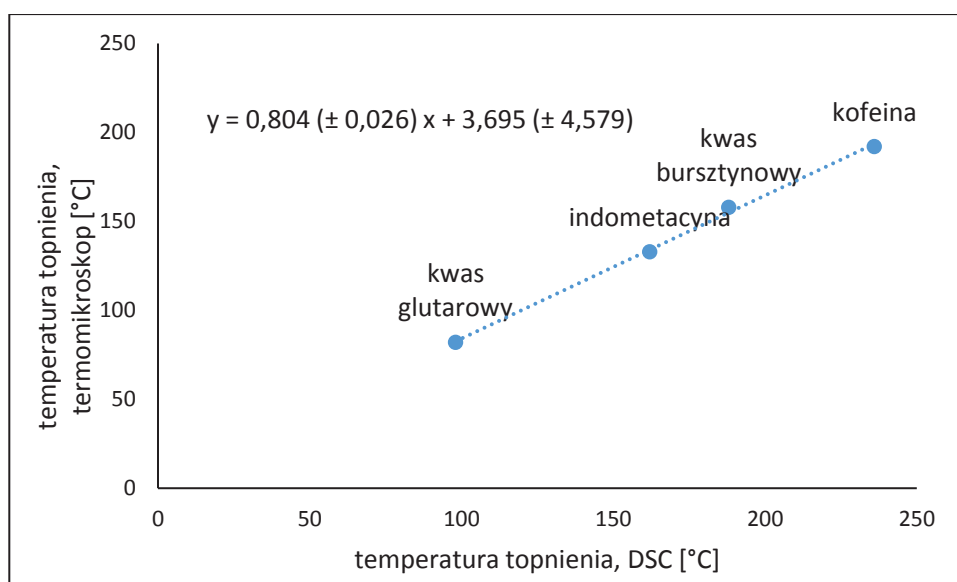
Spektroskopia Ramana

Widma Ramana rejestrowano za pomocą spektrometru DXR SmartRaman (Thermo Fisher Scientific, Madison, USA), wyposażonego w laser DXR 780 nm, filtr Rayleigha, detektor CCD i oprogramowanie Omnic for Dispersive Raman. Widma rejestrowano w zakresie liczb falowych 3413-99 cm^{-1} . Wykorzystano laser o mocy 15 mW i szczelinę 25 μm . Próbkę umieszczono w uchwycie do próbek sproszkowanych i skanowano 2-krotnie przy jedno-sekundowej ekspozycji.

Termomikroskopia

Prowadzono obserwację próbek z wykorzystaniem termomikroskopu BX41 (Olympus, Shinjuku, Japonia), wyposażonego w kamerę cyfrową SC30 z oprogramowaniem Olympus Cella oraz mikroskopowy stolik grzejny Semic (Bioelektronika, Kraków) z regulatorem temperatury SR90 (Shimaden, Tokio, Japonia) i oprogramowaniem Heating Desc Shimaden. Badania prowadzono w zakresie temp. 25-300°C.

Kalibrację temperatury stolika grzejnego przeprowadzono na podstawie temperatury topnienia kwasu glutarowego (99%), indometacyny ($\geq 99\%$) i kwasu bursztynowego ($\geq 99\%$) (wszystkie wzorce zakupiono w Sigma-Aldrich, Steinheim, Niemcy) oraz KOF. Uzyskano zależność liniową ($r = 0,9990$) pomiędzy temperaturą topnienia wyznaczoną za pomocą termomikroskopu, a temperaturą topnienia wyznaczoną za pomocą DSC. Zależność tą przedstawiono na Rys. 7.



Rys. 7. Krzywa kalibracji temperatury termomikroskopu wobec DSC.

4. Obliczenia statystyczne

Obliczenia statystyczne przeprowadzono przy użyciu arkusza kalkulacyjnego MS Office Excel 2013. Obejmowały one wyznaczenie równania krzywej kalibracji, $y=ax+b$ ze współczynnikami a i b oraz przedziałami ufności tych wartości (Δa i Δb) na poziomie istotności $\alpha = 0,05$, wg wzorów:

$$\Delta a = S_a \cdot t; \quad \Delta b = S_b \cdot t$$

Wartość parametru t zależy od liczby stopni swobody i dla trzech oznaczeń wynosi 4,303 [146]. Granice wykrywalności (LOD - *Limit of detection*) i oznaczalności (LOQ - *Limit of Quantification*) obliczono na podstawie błędu standardowego (S_{xy}) i współczynnika kierunkowego prostej (a) wg wzorów:

$$LOD = \frac{3,3 \cdot S_{xy}}{a}; \quad LOQ = \frac{10 \cdot S_{xy}}{a}$$

Dla każdej mieszaniny wzorcowej, sporządzonej celem przygotowania krzywej kalibracji, obliczono wartość błędu względnego, na podstawie różnicy entalpii topnienia wyznaczonej eksperymentalnie i wartości wyznaczonej zgodnie z równaniem regresji. Wartość błędu wyrażono w procentach.

Zakres metody stanowił przedział zawartości substancji czynnej w mieszaninie, mieszczący się w zakresie od granicy oznaczalności do zawartości substancji czynnej, dla której obliczona wartość błędu względnego nie przekroczyła 3%.

WYNIKI DOŚWIADCZEŃ I Dyskusja

1. Różnicowa kalorymetria skaningowa

Podjęto próbę oceny możliwości wykorzystania DSC do oznaczeń substancji czynnych w mieszaninach z wybranymi substancjami pomocniczymi oraz w handlowych preparatach farmaceutycznych. Analiza ilościowa opierała się na zależności entalpii topnienia substancji leczniczej od jej ilości w próbce. Do interpretacji ilościowej krzywych DSC wykorzystano powierzchnię lub wysokość piku topnienia substancji leczniczej. Warunkiem przeprowadzenia oznaczenia był brak interakcji między składnikami próbki, które mogłyby zakłócić proces topnienia substancji leczniczej.

W pierwszej kolejności sporządzono mieszaniny PAR i ASA z tlenkiem glinu, który jest substancją bardzo mało reaktywną i w zakresie temperatur prowadzonych badań nie wykazuje przemian termicznych. Badanie tych mieszanin miało na celu stwierdzenie, czy tak obojętna chemicznie i termicznie substancja może wpływać na entalpię topnienia substancji czynnej w mieszaninie.

Do sporządzenia kolejnych mieszanin z udziałem PAR i ASA wykorzystano substancje pomocnicze najczęściej używane w technologii postaci leku jako wypełniacze, w celu sprawdzenia, czy składniki pomocnicze preparatów farmaceutycznych mogą wpływać na entalpię topnienia substancji czynnych. Dokonując analizy danych zestawionych w Tabelach 5 i 6, do sporządzenia mieszanin wybrano HPMC, laktozę, sacharozę i skrobię ziemniaczaną. Częstym składnikiem preparatów handlowych jest też stearynianu magnezu, który do stałych postaci leku jest dodawany w niewielkiej ilości (0,25-2%) jako substancja poślizgowa [147, 148]. Jest to składnik, który z niektórymi substancjami leczniczymi, np. ASA, wykazuje niezgodność [95]. Wykorzystując tą substancję pomocniczą sporządzono dwie wzorcowe matryce tabletkowe zawierające dodatek 4% stearynianu magnezu: pierwsza składająca się z laktozy, druga z HPMC. Wykorzystano te matryce do przygotowania wzorcowych mieszanin tabletkowych z PAR, w celu sprawdzenia ewentualnego wpływu dodatku stearynianu magnezu na entalpię topnienia substancji czynnej. Zawartość PAR i ASA w handlowych preparatach farmaceutycznych oznaczono kalibrując DSC za pomocą metody krzywej kalibracji.

Tabela 5. Skład jakościowy preparatów zawierających PAR.

Nazwa handlowa	Substancje pomocnicze
Apap	wosk Carnauba, hypromeloza, makrogol, powidon, skrobia żelowana, kroskarmeloza sodowa, kwas stearynowy
Panadol	skrobia kukurydziana, potasu sorbinian, talk, kwas stearynowy, powidon (K 25), skrobia żelowana otoczka: hypromeloza, triacetyna
Paracetamol Polfa Łódź	sorbitol, skrobia ziemniaczana, powidon, magnezu stearynian
Paracetamol Apteomed	sorbitol, skrobia ziemniaczana, powidon, magnezu stearynian

Tabela 6. Skład jakościowy preparatów zawierających ASA.

Nazwa handlowa	Substancje pomocnicze
Polopiryna S	skrobia kukurydziana, celuloza sproszkowana, celuloza mikrokrystaliczna
Aspirin Pro	krzemionka koloidalna bezwodna, sodu węglan bezwodny otoczka: wosk Carnauba, hypromeloza, cynku stearynian
Acard	celuloza mikrokrystaliczna, skrobia kukurydziana, kwas stearynowy, krzemionka koloidalna uwodniona, kwas metakrylowy, etylu akrylanu kopolimer (1:1), trietylu cytrynian, talk, emulsja antypienna
Polocard	skrobia kukurydziana, celuloza proszek, karboksymetyloskrobia sodowa, hypromeloza, kopolimer kwasu metakrylowego, trietylu cytrynian, tytanu ditlenek (E 171), talk, sodu laurylosiarczan, czerwien koszenilowa, lak (E 124), krzemionka koloidalna bezwodna, sodu wodorowęglan

Tabela 7. Skład jakościowy preparatów zawierających TF i pochodne celulozy jako substancje pomocnicze.

Nazwa handlowa	Substancje pomocnicze
Theospirex retard 150	Eudragit RS PO, povidon 25000, talk, magnezu stearynian, hypromeloza, ditlenek tytanu, triacetyna, glikol polietylenowy 6000, woda oczyszczona
Theospirex retard 300	amoniowy polimetakrylan, poliwinylpirolidon, talk, magnezu stearynian, hypromeloza, ditlenek tytanu, trójoctan glicerolu, glikol polietylenowy
Afonilum SR	etyloceluloza, ditlenek krzemu strącony, żelatyna, indygotyna, sól sodowa sulfobursztynianu dioktylowego, poliowidon, talk, ditlenek tytanu, sodu laurylosiarczan
Theovent 300	glikolan sodowy skrobi, talk, magnezu stearynian, celuloza mikrokrystaliczna, sylfid 244, emulsja SE2, cytrynian trietylu, Eudragit RS-30, Eudragit RL-30D

Tabela 8. Skład jakościowy preparatów zawierających TF i laktozę jako substancję pomocniczą.

Nazwa handlowa	Substancje pomocnicze
Euphyllin CR 250	laktoza jednowodna, żelatyna, magnezu stearynian, hypromeloza, otoczka: Opadry OY-S-6523: (hypromeloza, povidon K 25, ditlenek tytanu, indygotyna, makrogol 400, sacharyna
Euphyllin long 200	metyloceluloza, celuloza mikrokrystaliczna, sól sodowa karboksymetylocelulozy, octan celulozy, cytrynian trietylu, laktoza jednowodna, talk
Euphyllin long 300	metyloceluloza, celuloza mikrokrystaliczna, sól sodowa karboksymetylocelulozy, octan celulozy, cytrynian trietylu, laktoza jednowodna, talk
Theoplus 100	laktoza
Theoplus 300	laktoza
Theovent 100	laktoza, skrobia kukurydziana, glikolan sodowy skrobi, koloidalny ditlenek krzemu, magnezu stearynian, celuloza mikrokrystaliczna

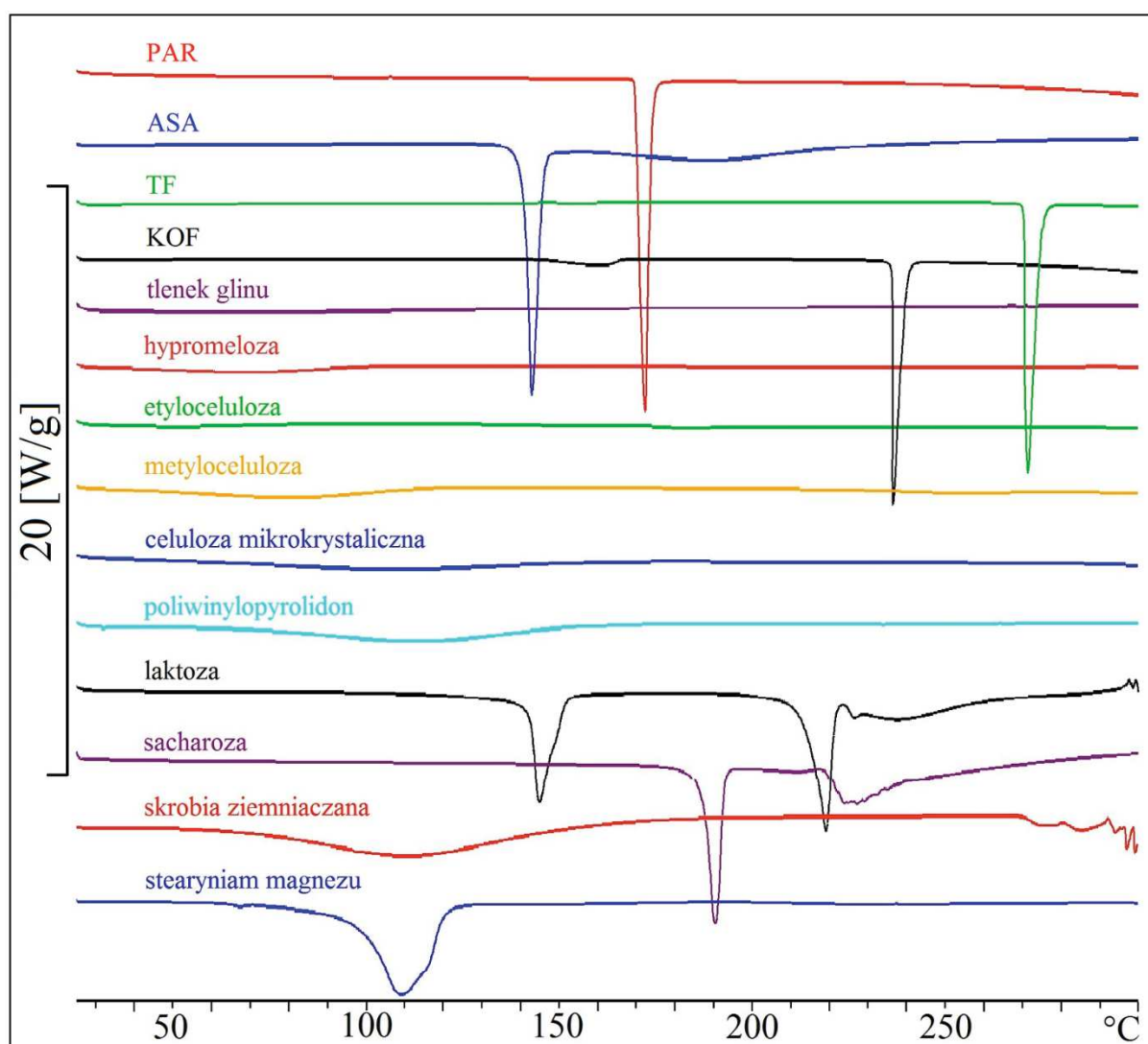
Przygotowano również mieszaniny PAR, ASA, KOF i TF z HPMC o stężeniach substancji czynnej 0,5; 1; 2; 5 oraz od 10 do 50%, co 10%. Miało to na celu zbadanie, jaki wpływ ma dodatek HPMC na zależność liniową entalpii topnienia od stężenia, gdy zawartość polimeru przekracza 50% składu mieszaniny. Dodatkowo, sporządzono mieszaniny zawierające powyższe substancje czynne w stężeniu 5-95% z HPMC przez homogenizację składników kartą celulozową. Sporządzenie tych mieszanin miało na celu sprawdzenie, w jakim stopniu homogenizacja z użyciem pistla mogła spowodować oddziaływania międzycząsteczkowe pomiędzy substancją czynną a pomocniczą.

W oparciu o analizę składu preparatów handlowych zawierających teofilinę (Tabele 7 i 8) stwierdzono, że możliwe jest skategoryzowanie badanych produktów do dwóch grup, w których laktoza lub jedna z pochodnych celulozy były dominującymi substancjami pomocniczymi. Wiele preparatów zawierało również stearynian magnezu. Kierując się powyższymi danymi, sporządzono wzorcowe mieszaniny tabletkowe z TF korzystając z matryc składających się z HPMC lub laktozy z dodatkiem 4% stearynianu magnezu. Zakres stężeń TF w tych mieszaninach dobrano na podstawie zawartości substancji czynnej w produktach farmaceutycznych (Tabele 3 i 4).

1.1 Charakterystyka badanych substancji

Przeprowadzono badania DSC w zakresie temp. 25-300°C PAR, ASA, TF, KOF oraz tlenku glinu i wybranych substancji pomocniczych: HPMC, etylocelulozy, metylocelulozy,

celulozy mikrokrystalicznej, PVP, laktozy, sacharozy, skrobi ziemniaczanej i stearynianu magnezu. Wyniki badań przedstawiono na Rys. 8. Krzywe DSC substancji leczniczych odznaczają się ostrymi pikami związanymi z topnieniem. Zakresy temperatur topnienia są zgodne z danymi literaturowymi, co przedstawiono w Tabeli 9. W przypadku PAR, który występuje w dwóch formach krystalicznych: I – jednoskośnej oraz II – rombowej, temperatura topnienia PAR odpowiada formie I. Dodatkowo, na krzywej DSC KOF widoczny jest rozmyty pik w zakresie temp. ok. 140-160°C, związany z przemianą polimorficzną bezwodnej substancji, tj. przejściem formy II w I [149].



Rys. 8. Krzywe DSC badanych substancji leczniczych i pomocniczych.

Wyniki uzyskane dla tlenku glinu i większości substancji pomocniczych (HPMC, etylocelulozy, metylocelulozy, celulozy mikrokrystalicznej, PVP) w badanym zakresie temperatur wskazują na brak pików związanych w przemianami fazowymi. Na krzywej DSC HPMC w temp. poniżej 120°C widoczny jest natomiast rozmyty pik związany z dehydratacją

[1]. Dwa endotermiczne piki na krzywej DSC laktozy odpowiadają utracie wody krystalicznej oraz topnieniu α -laktozy [150,151]. W przypadku sacharozy, krzywa DSC uwidacznia pojedynczy, endotermiczny pik w temp. ok. 190°C, odzwierciedlający jej topnienie z rozkładem [151].

Tabela 9. Temperatury topnienia substancji leczniczych, wartości literaturowe i wyznaczone eksperymentalnie.

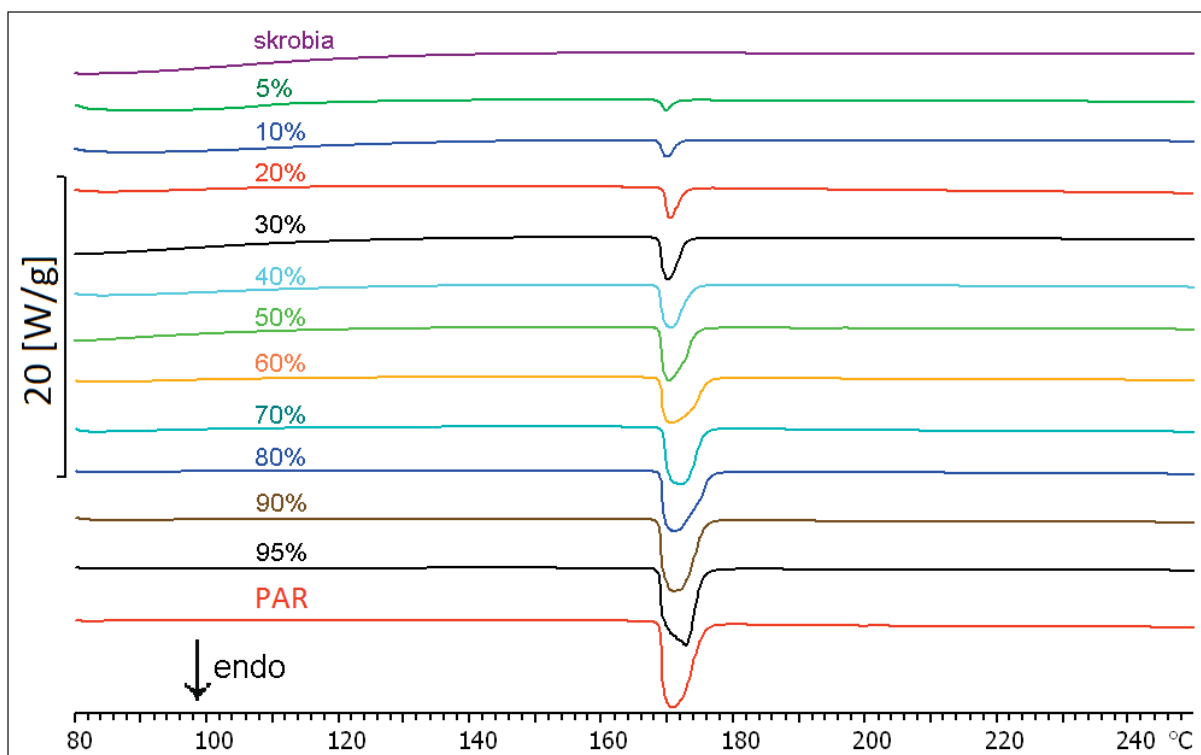
Substancja lecznicza	Literaturowa temperatura topnienia [°C] [152]	Temperatura początku pik DSC związanego z topnieniem [°C]
PAR	168-172	169,40
ASA	143	143,02
TF	270-274	271,82
KOF	234-239	236,19

Efekt endotermiczny związany z dehydratacją laktozy przebiega w zakresie temperatur częściowo pokrywającym się z zakresem topnienia ASA. Stearynian magnezu w mieszaninach z ASA powoduje częściową hydrolizę substancji leczniczej, z utworzeniem kwasu salicylowego. ASA z kwasem salicylowym tworzą natomiast mieszaninę eutektyczną [153]. Z tego powodu, do sporządzenia mieszanin wzorcowych z ASA nie wykorzystano ani stearynianu magnezu, ani laktozy.

1.2 Paracetamol

Analizowano mieszaniny PAR z tlenkiem glinu, HPMC, HPMC z dodatkiem stearynianu magnezu, laktozą, laktozą z dodatkiem stearynianu magnezu, sacharozą i skrobią. Pik topnienia substancji leczniczej we wszystkich mieszaninach zmniejszał się wraz z malejącym udziałem PAR w mieszaninie. Przykładowe zestawienie krzywych DSC, na których pik topnienia obecny był na wszystkich krzywych i zmniejszał się wraz z malejącą zawartością substancji czynnej, przedstawiono na Rys. 9.

Na krzywych DSC mieszanin PAR z tlenkiem glinu, zawierających substancję czynną w stężeniu poniżej 20%, nie był widoczny endotermiczny pik topnienia PAR. Wykreślono krzywą kalibracji zależności entalpii topnienia PAR od jego zawartości w mieszaninie z tlenkiem glinu, w zakresie stężeń 20-95% substancji czynnej i uzyskano liniową zależność, o czym świadczy wysoka wartość współczynnika korelacji 0,9989. W tym przypadku nie ma zastosowania LOD i LOQ, obliczone na podstawie błędu standardowego, ponieważ uzyskane wartości znajdują się w zakresie stężeń, dla których nie był widoczny na krzywej DSC pik topnienia PAR. Jako początek zakresu metody uznano w tym przypadku najniższą zawartość PAR, przy której widoczny był pik topnienia PAR.



Rys. 9. Krzywe DSC mieszanin PAR ze skrobią, otrzymane w wyniku mieszania składników pistlem.

Wyniki uzyskane dla mieszanin PAR z HPMC (Rys. 10) oraz z HPMC z dodatkiem stearynianu magnezu, sporządzonych przez mieszanie składników pistlem, również wskazują na proporcjonalną zależność entalpii topnienia od zawartości PAR w mieszaninach. Efekt endotermiczny związany z topnieniem PAR nie był jednak widoczny w mieszaninach zawierających poniżej 20% substancji leczniczej. W związku z tym, liniową zależność powierzchni pików PAR od jego stężenia uzyskano wyłącznie dla zakresu 20-95%. Współczynniki korelacji liniowej wyniosły odpowiednio 0,9986 i 0,9924 dla mieszanin PAR z HPMC oraz PAR z HPMC i dodatkiem stearynianu magnezu. Wysokie i ujemne wartości wyrazu wolnego w równaniach regresji (w obu przypadkach -37,45), mogą wskazywać na interakcję, w wyniku której część substancji czynnej może tracić formę krystaliczną. Może to być związane z tworzeniem się formy amorficznej substancji czynnej pod wpływem HPMC, bądź z częściowym rozpuszczeniem PAR w polimerze. Dla tych mieszanin nie mają zastosowania LOD i LOQ obliczone na podstawie błędów standardowych, ponieważ wartości te znajdują się poniżej 20% PAR. Również w tych przypadkach za początek zakresu metody uznano zawartość 20% substancji czynnej.

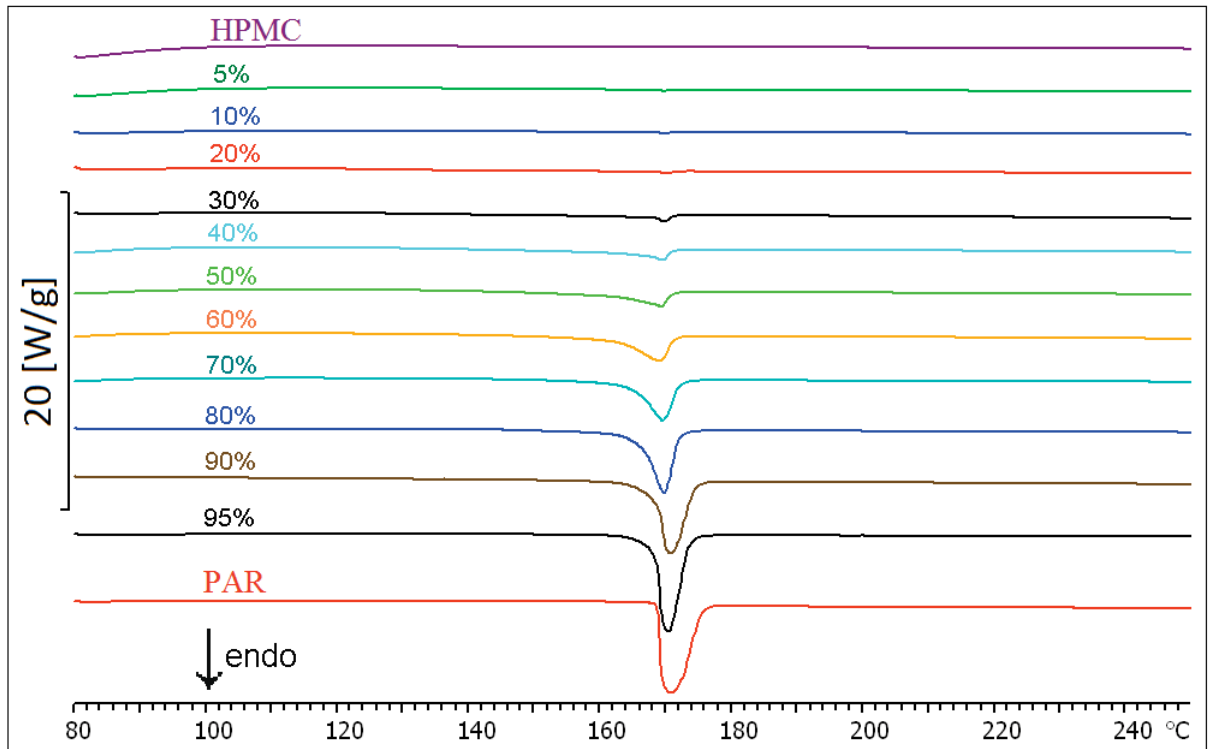
Na wszystkich krzywych DSC mieszanin PAR z HPMC uzyskanych przez mieszanie składników kartą celulozową, endotermiczny pik topnienia PAR był widoczny i był proporcjonalny do zawartości substancji czynnej w mieszaninie. Współczynnik korelacji

uzyskany w oparciu o entalpię topnienia PAR dla tych mieszanin wyniósł 0,9986. Wyraz wolny w równaniu regresji (-12,39) ma dużą wartość ujemną. Jest ona jednak znacząco mniejsza niż w przypadku krzywych uzyskanych z tych samych składników przez ich mieszanie pistlem. Stopień nasilenia niezgodności między składnikami jest więc zależny od sposobu przygotowania mieszanin.

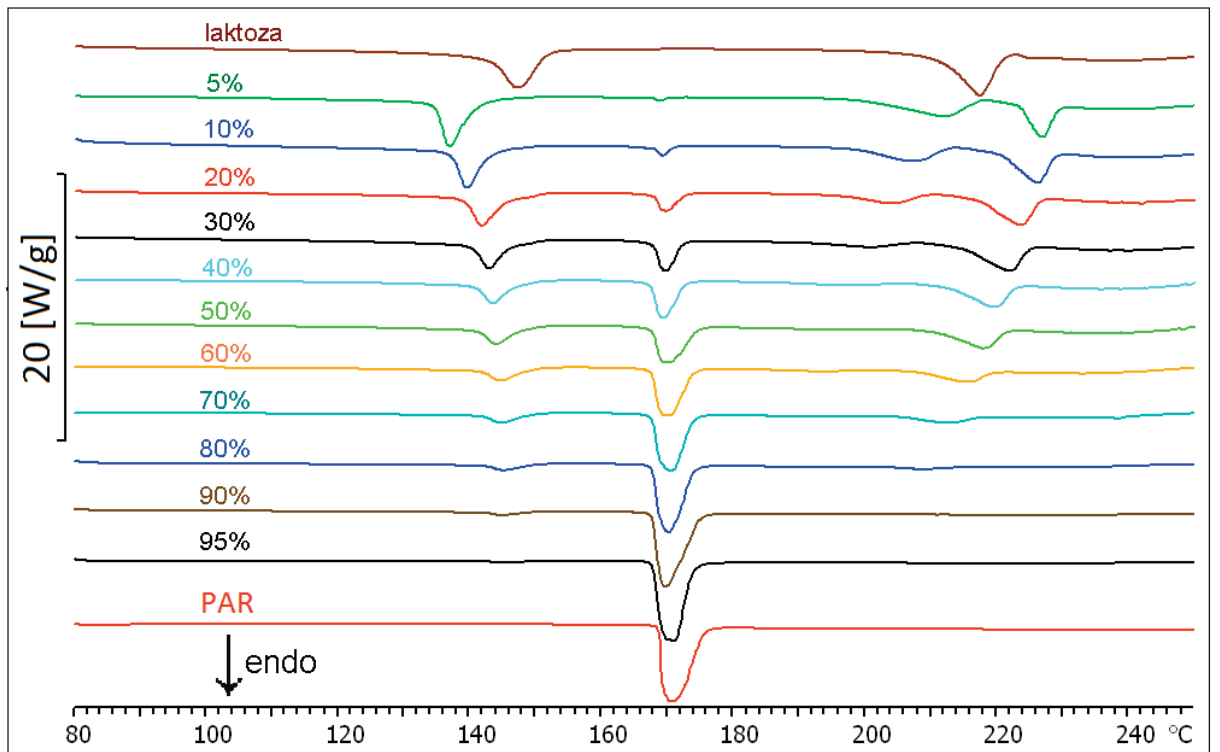
W literaturze opisano interakcję fizyczną pomiędzy PAR i Kollidionem CL, który podobnie do HPMC jest polimerem o budowie amorficznej i właściwościach higroskopijnych [154]. Odzwierciedla ją przesunięcie piku topnienia PAR w kierunku niższych temperatur, w stosunku do temperatury topnienia substancji czynnej, co zdaniem autorów wiąże się z procesem technologicznym, w którym stosowano lepiszcze. Nie stwierdzono natomiast niezgodności chemicznej pomiędzy składnikami.

Na krzywych DSC mieszanin PAR z pozostałymi substancjami pomocniczymi, pik związany z topnieniem substancji czynnej był widoczny w całym zakresie analizowanych stężeń i był proporcjonalny do zawartości PAR w mieszaninie. Dodatkowo, pik topnienia sacharozy w przypadku jej mieszanin z PAR uległ poszerzeniu i przesunięciu w kierunku niższych temperatur. Wyniki uzyskane dla mieszanin zawierających laktozę wskazują na wyraźne piki związane z dehydratacją i topnieniem substancji pomocniczej (Rys. 11). Pik związany z dehydratacją uległ jednak przesunięciu w kierunku temperatur wyższych, zaś drugi, związany z topnieniem laktozy, uległ deformacji.

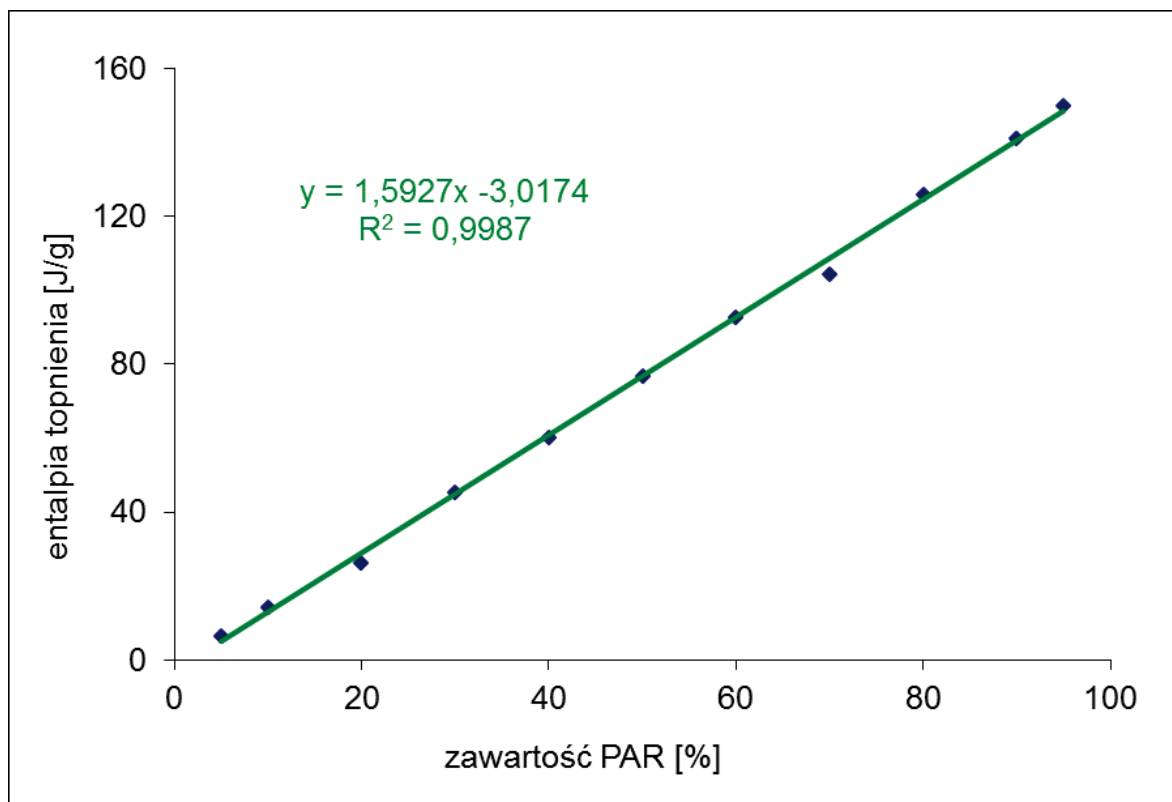
W przypadku mieszanin PAR z laktozą, sacharozą i skrobią oraz laktozą z dodatkiem stearynianu magnezu, w całym zakresie analizowanych stężeń uzyskano liniową zależność entalpii topnienia substancji leczniczej od jej zawartości w mieszaninie, a współczynnik korelacji wyniósł średnio 0,9987 ($\pm 0,0012$). Modelową krzywą kalibracyjną przedstawiono na Rys. 12.



Rys. 10. Krzywe DSC mieszanin PAR z HPMC, otrzymane w wyniku mieszania składników pistlem.



Rys. 11. Krzywe DSC mieszanin PAR z laktozą, otrzymane w wyniku mieszania składników pistlem.



Rys. 12. Krzywa zależności entalpii topnienia PAR od jego zawartości w mieszaninie ze skrobią.

Tabela 10. Parametry regresyjne krzywych kalibracji oraz granice wykrywalności i oznaczalności metod oznaczania PAR w mieszaninach z tlenkiem glinu, sacharozą, skrobią i laktozą. Mieszanki homogenizowano pistlem.

Parametr	Substancja pomocnicza				
	Tlenek glinu	Sacharoza	Skrobia	Laktoza	Laktoza ze stearynianem magnezu
Zawartość PAR w mieszaninach [%]	5-95	5-95	5-95	5-95	5-95
$a \pm \Delta a$	1,98±0,34	1,75±0,21	1,59±0,09	1,65±0,09	1,65±0,09
S_a	0,08	0,05	0,02	0,02	0,02
$b \pm \Delta b$	-43,38±9,90	1,82±12,34	-3,02±4,82	-6,14±5,25	-8,10±4,43
S_b	2,30	2,87	1,12	1,22	1,03
r	0,9989	0,9965	0,9993	0,9993	0,9995
S_{xy}	2,68	4,92	1,92	2,09	1,76
LOD [%]	4,47	9,25	3,98	4,18	3,52
LOQ [%]	13,55	28,04	12,07	12,68	10,66
Zakres metody [%]	20,0–95,0	28,0–90,0	12,1–95,0	12,7–95,0	10,7–95,0

Tabela 11. Parametry regresyjne krzywych kalibracji oraz granice wykrywalności i oznaczalności metod oznaczania PAR w mieszaninach z HPMC.

Parametr	HPMC		
	Mieszanie pistlem	Mieszanie kartą celuloidową	Z dodatkiem stearynianu magnezu, mieszanie pistlem
Zawartość PAR w mieszaninach [%]	5-95	5-95	5-95
$a \pm \Delta a$	1,81±0,17	1,85±0,09	1,76±0,12
S_a	0,04	0,02	0,03
$b \pm \Delta b$	-37,45±10,16	-12,39±5,81	-37,45±9,68
S_b	2,36	1,35	2,25
r	0,9986	0,9986	0,9924
S_{xy}	2,74	2,83	2,62
LOD [%]	4,98	5,05	4,91
LOQ [%]	15,10	15,31	14,88
Zakres metody [%]	20,0–95,0	15,3–95,0	20,0–95,0

Wykorzystując parametry opisujące równanie regresji krzywej kalibracji, obliczono LOD i LOQ, a uzyskane wartości zastawiono w Tabelach 10 i 11. Najniższe wartości LOD i LOQ uzyskano dla mieszanin PAR z laktozą z dodatkiem stearynianu magnezu, wyniosły one odpowiednio 3,52% i 10,66%. Wartości błędu względnego obliczone dla poszczególnych mieszanin wzorcowych, użytych do sporządzenia krzywej kalibracji, wyniosła od 1,76% do 4,92%.

Dla mieszanin PAR z sacharozą i skrobią, w zakresie przedziału ufności wyrazu wolnego znajduje się początek układu współrzędnych. Dla pozostałych krzywych uzyskane wartości wyrazu wolnego są znaczące i mogą świadczyć o występowaniu błędu systematycznego. Przyczyną błędu systematycznego może być utrata krystaliczności przez część substancji czynnej. Amorfizacja może wynikać z oddziaływań pomiędzy PAR i substancjami pomocniczymi [77,80]. Możliwe jest również rozpuszczanie części substancji czynnej w substancjach pomocniczych, a także przejścia międzyfazowe wywołane na skutek homogenizacji składników w młynku z użyciem pistla.

Preparaty z paracetamolem

Preparaty z paracetamolem wybrane do analizy zawierają powyżej 60% PAR. Przeprowadzona kalibracja metody DSC wskazała na liniową zależność sygnału analitycznego od stężenia PAR w zakresie zawartości substancji leczniczej w preparatach. Spodziewano się więc, że wyniki oznaczenia PAR w handlowych preparatach farmaceutycznych będą zgodne z zawartością substancji czynnej, obliczoną w oparciu o średnią masę tabletki i dawkę PAR w niej zawartą (Tabela 1).

Tabela 12. Wyniki oznaczeń PAR w handlowych preparatach farmaceutycznych.

Preparat	Zawartość paracetamolu w tabletkach [g]	Wynik oznaczenia paracetamolu [g]	Różnica [%]
Apap	0,5	0,4257	-14,57
Panadol	0,5	0,5390	7,79
Paracetamol Polfa Łódź	0,5	0,4875	-2,50
Paracetamol ApteoMed	0,5	0,4927	-1,47

Dla każdego preparatu opracowano krzywą kalibracji, biorąc pod uwagę skład jakościowy matrycy tabletki. Wyniki oznaczeń zestawiono w Tabeli 12. Zgodnie z wymogami Farmakopei Polskiej VI [1], w przypadku analizy ilościowej substancji leczniczej w tabletkach i kapsułkach, dla preparatów zawierających substancję czynną w ilości powyżej 100 mg, odchylenie od zawartości deklarowanej nie może przekraczać 5%. Dla preparatów Paracetamol Polfa Łódź i Paracetamol ApteoMed uzyskano odchylenie od wartości deklarowanej odpowiednio 2,5 i 1,47%. Dla dwóch pozostałych produktów odchylenie to przekroczyło wymagany przez FP próg 5%. Wyniki te są mało zadowalające, a uzyskane różnice mogą być spowodowane wieloma czynnikami, m.in. trudnym do odtworzenia składem matrycy tabletkowej, w tym obecnością substancji pomocniczych występujących w małych ilościach, które mogą wpływać na entalpię topnienia substancji czynnej.

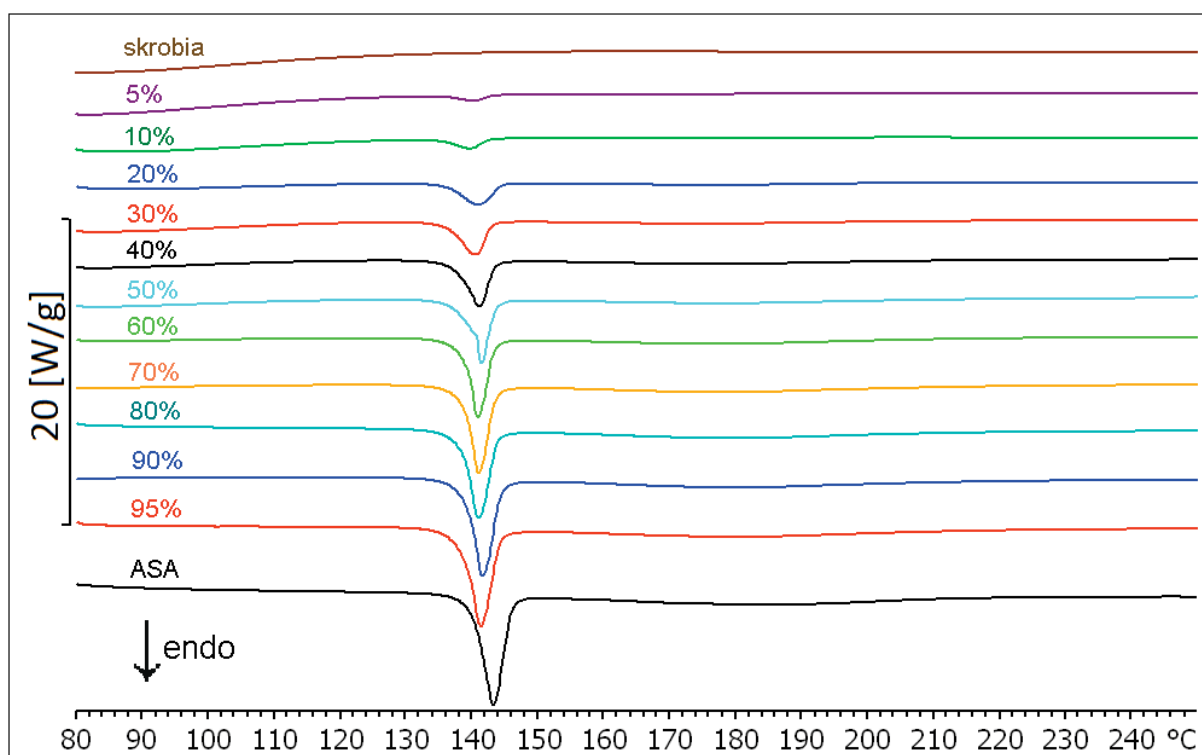
1.3 Kwas acetylosalicylowy

Przeprowadzono analizę DSC ASA i wzorcowych mieszanin substancji czynnej z tlenkiem glinu. Uzyskane krzywe uwidaczniają wąski i ostro zakończony, endotermiczny pik związany z topnieniem substancji leczniczej. W przypadku mieszanin, pik topnienia ASA znajduje się w zakresie temperatur niższych niż temperatura pików substancji leczniczej, ale jego powierzchnia jest proporcjonalna do zawartości ASA w mieszaninie. Na podstawie uzyskanych danych wyznaczono krzywą kalibracji przedstawiającą zależność entalpii topnienia substancji leczniczej od jej zawartości w mieszaninach, w zakresie od 5% do 95%, uzyskując współczynnik korelacji 0,9980.

Na krzywych DSC mieszanin ASA z HPMC, sacharozą i skrobią widoczny jest również endotermiczny pik związany z topnieniem ASA, którego powierzchnia zwiększa się proporcjonalnie do zawartości substancji leczniczej w mieszaninach. Przykładowe krzywe DSC mieszanin ASA ze skrobią zilustrowano na Rys. 13. Pik związany z topnieniem ASA w mieszaninach z HPMC znajduje się w zakresie temperatur niższych niż pik topnienia substancji czynnej, a w mieszaninach o zawartości ASA poniżej 30%, uległ również istotnemu

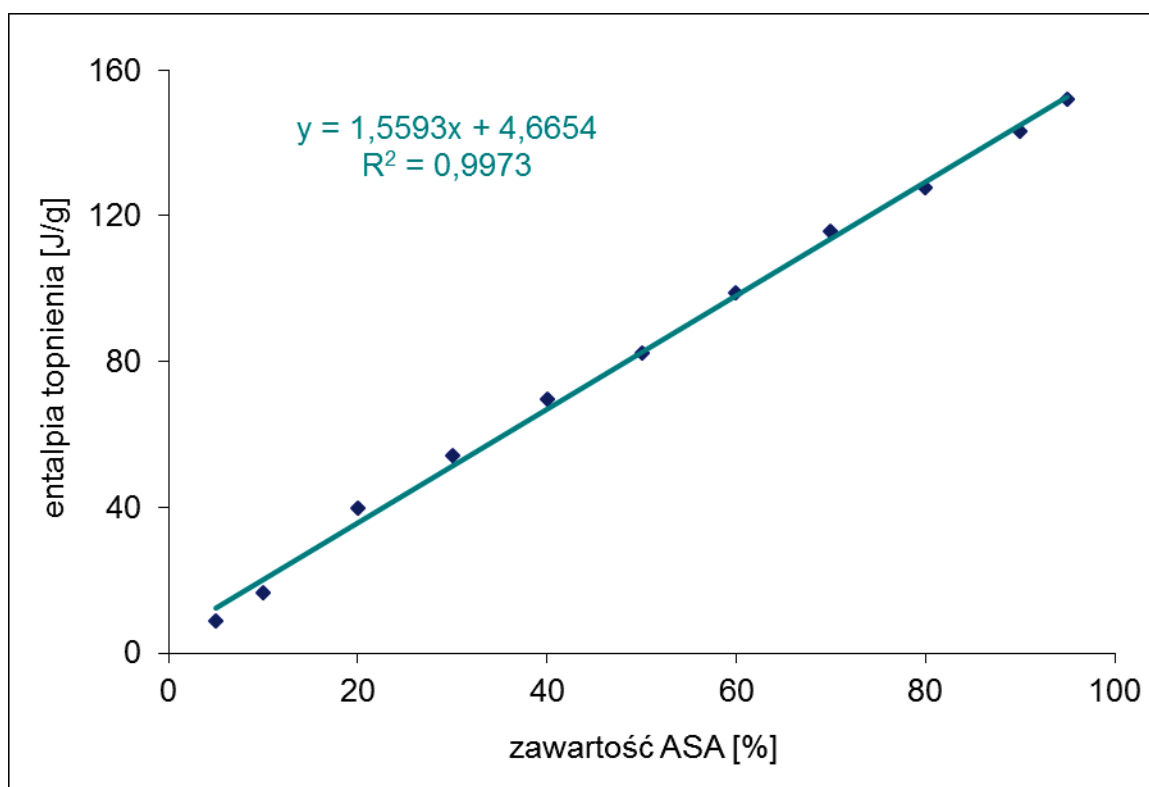
poszerzeniu i spłaszczeniu. Pik DSC związany z topnieniem sacharozy w mieszaninach z ASA uległ istotnemu poszerzeniu i spłaszczeniu, nie wpływa to jednak na kształt piku związanego z topnieniem substancji czynnej.

W zakresie analizowanych stężeń uzyskano liniową zależność powierzchni endotermicznego piku topnienia ASA od zawartości tej substancji w mieszaninach z HPMC, sacharozą i skrobią. Odpowiednio dla tych mieszanin uzyskano współczynniki korelacji 0,9993; 0,9978 i 0,9986. Przykładową krzywą kalibracji, przedstawiono na Rys. 14.



Rys. 13. Krzywe DSC mieszanin ASA ze skrobią.

W Tabeli 13 zestawiono parametry regresyjne krzywych kalibracji oraz wartości granic wykrywalności i oznaczalności dla opracowanych metod. Najniższe wartości LOD i LOQ uzyskano dla mieszaniny ASA z HPMC, wyniosły one odpowiednio 4,06% i 12,29%. Wartość błędu względnego obliczona dla poszczególnych stężeń wzorca wykorzystanych do opracowania krzywych kalibracji wyniosła od 1,76% do 3,48%. Dla mieszanin ASA z sacharozą i skrobią, w zakresie przedziału ufności wyrazu wolnego znajduje się początek układu współrzędnych. W przypadku pozostałych krzywych, wyraz wolny w równaniu regresji różnił się istotnie statystycznie od zera, co może świadczyć o błędzie systematycznym metody.



Rys. 14. Krzywa zależności entalpii topnienia ASA od jego zawartości w mieszaninach ze skrobią.

Tabela 13. Parametry regresyjne krzywych kalibracji oraz granice wykrywalności i oznaczalności metod oznaczania ASA w mieszaninach.

Parametr	Substancja pomocnicza			
	Tlenek glinu	HPMC	Sacharoza	Skrobia
Zawartość ASA w mieszaninach [%]	5-95	5-95	5-95	5-95
$a \pm \Delta a$	1,66±0,17	1,43±0,09	1,52±0,13	1,56±0,13
S_a	0,04	0,02	0,03	0,03
$b \pm \Delta b$	-11,61±8,74	-6,87±4,43	2,43±8,75	4,67±6,80
S_b	2,03	1,03	1,94	1,58
r	0,9980	0,9994	0,9978	0,9986
S_{xy}	3,48	1,76	3,33	2,71
LOD [%]	6,93	4,06	7,25	5,75
LOQ [%]	20,99	12,29	21,96	17,41
Zakres metody [%]	21,0–95,0	12,3–95,0	22,0–95,0	17,4–95,0

Preparaty z ASA

W preparatach farmaceutycznych wybranych do badań, zawartość ASA przekraczała 59%. Wyniki oznaczeń uzyskane przy użyciu krzywych kalibracji zestawionych w Tabeli 13, przedstawiono w Tabeli 14. Dla większości badanych preparatów, różnica pomiędzy wynikami

oznaczeń, a deklarowaną zawartością substancji czynnej, nie przekroczyła progu 5%. Uzyskane wyniki są więc zgodne z oczekiwaniami. Jedynie dla preparatu Aspirin Pro różnica ta stanowiła ponad 14%.

Tabela 14. Wyniki oznaczenia ASA w handlowych preparatach farmaceutycznych.

Preparat	Zawartość ASA w tabletku [g]	Wynik oznaczenia	
		ASA [g]	Różnica [%]
Polopiryna S	0,3	0,2984	-0,54
Aspirin Pro	0,5	0,4278	-14,45
Acard	0,15	0,1442	-3,89
Polocard	0,15	0,1495	-0,33

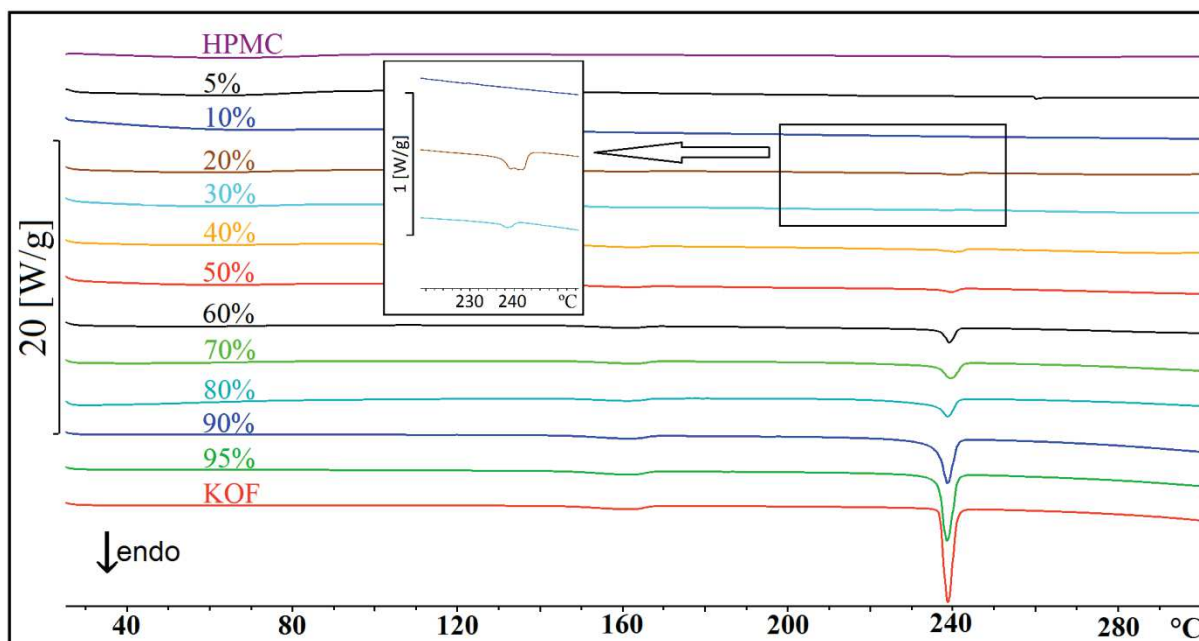
1.4 Metyloksantyny

Kofeina

Wykonano badania DSC mieszanin KOF z HPMC, uzyskanych przez mieszanie składników pistlem w moździerzu. Pik przemiany polimorficznej substancji leczniczej oraz pik topnienia KOF uległy poszerzeniu w porównaniu z efektami termicznymi substancji czynnej. Ponadto, pik topnienia KOF uległ przesunięciu w kierunku niższych temperatur. W mieszaninach zawierających od 5 do 20% substancji leczniczej, oba piki nałożyły się na siebie tworząc jeden, bardzo szeroki efekt DSC. Uniemożliwiło to interpretację ilościową krzywych DSC oraz uzyskanie liniowej zależności entalpii topnienia od zawartości KOF w mieszaninach o niższym stężeniu substancji aktywnej. Na krzywych DSC mieszanin zawierających poniżej 5% KOF, nie udało się wyodrębnić pików topnienia substancji leczniczej.

Wyniki uzyskane na podstawie analizy DSC mieszanin KOF z HPMC homogenizowanych kartą celulozową pokazują, że pik DSC związany z przemianą polimorficzną widoczny był na wszystkich krzywych mieszanin zawierających powyżej 10% KOF. Krzywe DSC tych mieszanin przedstawiono na Rys. 15. Pik topnienia KOF nie uległ przesunięciu i zmniejszał się wraz ze zmniejszającym się udziałem API w mieszaninie. Obserwowano też jego poszerzenie, jednak w mniejszym stopniu, niż w przypadku mieszanin uzyskanych przez mieszanie pistlem.

Opracowano krzywą kalibracji opisującą zależność entalpii topnienia KOF od jej zawartości w mieszaninach sporządzonych przez homogenizację składników kartą celulozową. Zależność liniową uzyskano jedynie dla zakresu stężeń 45-95% API ($r = 0,9811$).



Rys. 15. Krzywe DSC KOF i jej mieszanin z HPMC homogenizowanych kartą celuloidową.

Teofilina

Analizie poddano dwie serie wzorcowych mieszanin tabletkowych z TF uzyskanych w wyniku mieszania składników pistlem w moździerz. Jedną matrycę stanowiła laktoza ze stearynianem magnezu w ilości 4% w stosunku do zawartości laktozy, natomiast drugą matrycą była mieszanina złożona z HPMC i stearynianu magnezu w ilości 4% w odniesieniu do zawartości HPMC w mieszaninie. Analizie poddano również mieszaniny TF z HPMC w zakresie zawartości 0,5-50%, uzyskane przez mieszanie składników pistlem oraz mieszaniny zawierające od 5 do 95% TF, otrzymane w wyniku mieszania składników przy pomocy karty celuloidowej. Ze względu na brak pików substancji pomocniczych na krzywych DSC w zakresie topnienia TF założono, że substancje pomocnicze wchodzące w skład badanych preparatów nie wpłyną na proces topnienia TF.

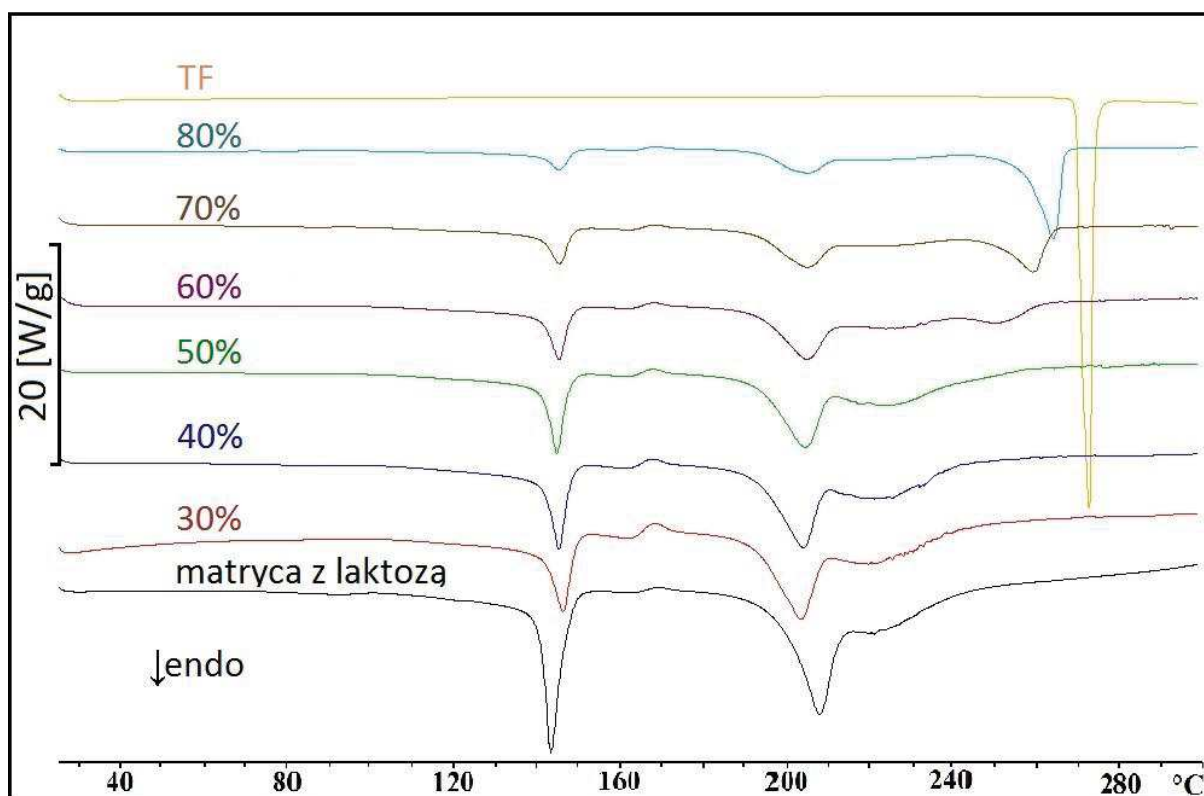
Krzywa kalibracji

Podjęto próbę kalibracji opracowanej procedury pomiarowej do oceny zawartości TF w handlowych preparatach farmaceutycznych za pomocą krzywej wzorcowej. Poszukiwano zależności pomiędzy powierzchnią i wysokością pików topnienia TF, a jej zawartością w mieszaninach fizycznych z substancjami pomocniczymi.

Matryca z laktozą i stearynianem magnezu

Przeprowadzono analizę DSC wzorcowych mieszanin tabletkowych z laktozą i dodatkiem stearynianu magnezu, zawierających wzrastające ilości TF. Uzyskane krzywe DSC

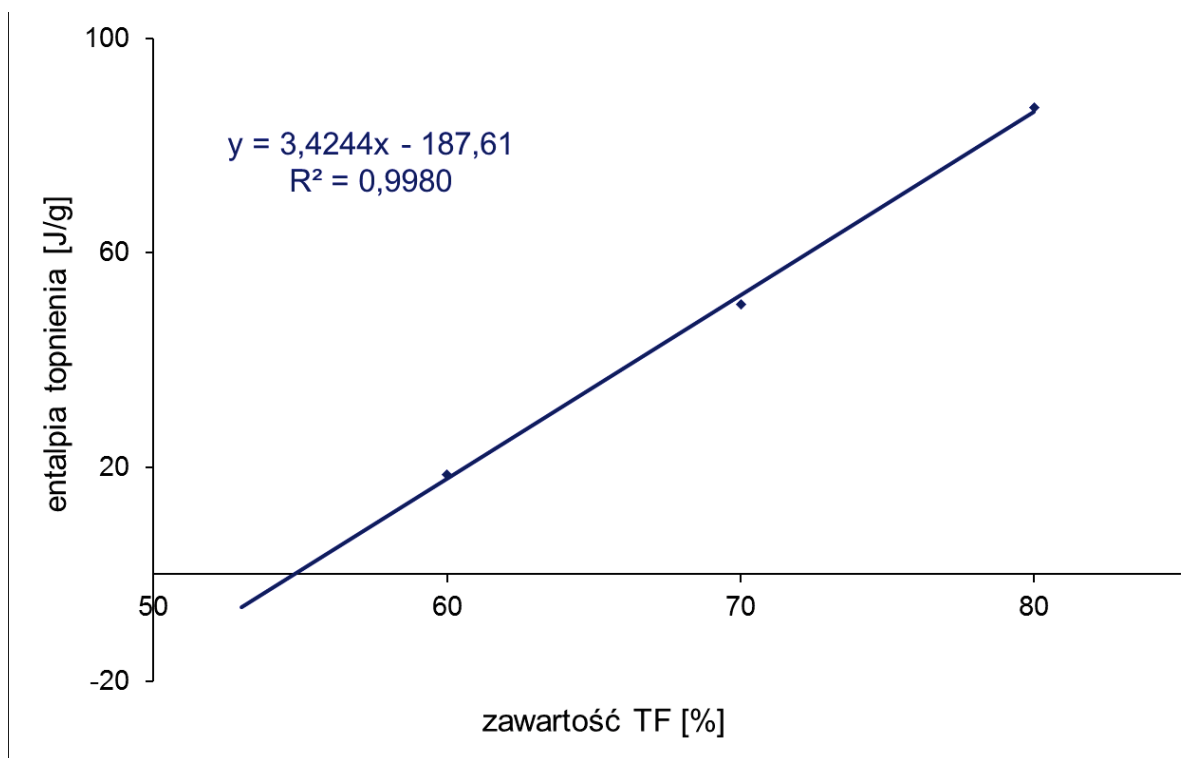
przedstawiono na Rys. 16. Wynika z nich, że w zakresie stężeń TF poniżej 50%, nie będzie możliwe oznaczenie tej substancji, ponieważ sygnał odpowiadający topnieniu TF pojawia się jako delikatne przegięcie krzywej. Dopiero przy stężeniu 60% TF występuje pik, który dodatkowo jest przesunięty w stronę niższych temperatur w stosunku do pików topnienia TF. Parametry regresyjne krzywych kalibracji, uzyskane na podstawie entalpii topnienia oraz wysokości pików topnienia przedstawiono w Tabeli 15.



Rys. 16. Krzywe DSC mieszanin o wzrastającej ilości TF w matrycy złożonej z laktozy z dodatkiem stearynianu magnezu.

Tabela 15. Parametry regresyjne krzywych kalibracji oraz granice wykrywalności i oznaczalności metod oznaczania TF w mieszaninach z laktozą i stearynianem magnezu.

Parametr	Entalpia topnienia TF	Wysokość pik
Zawartość teofiliny w mieszaninach [%]	30-80	30-80
$a \pm \Delta a$	$3,42 \pm 0,60$	$0,038 \pm 0,012$
S_a	0,14	0,003
$b \pm \Delta b$	$-187,6 \pm 43,72$	$-2,76 \pm 0,80$
S_b	10,16	0,185
r	0,9991	0,9977
S_{xy}	2,04	0,037
LOD [%]	1,97	3,18
LOQ [%]	5,96	9,63
Zakres metody [%]	60-80	60-80



Rys. 17. Zależność entalpii topnienia TF od jej zawartości w mieszaninach z laktozą i stearynianem magnezu.

Kalibracja na podstawie entalpii topnienia

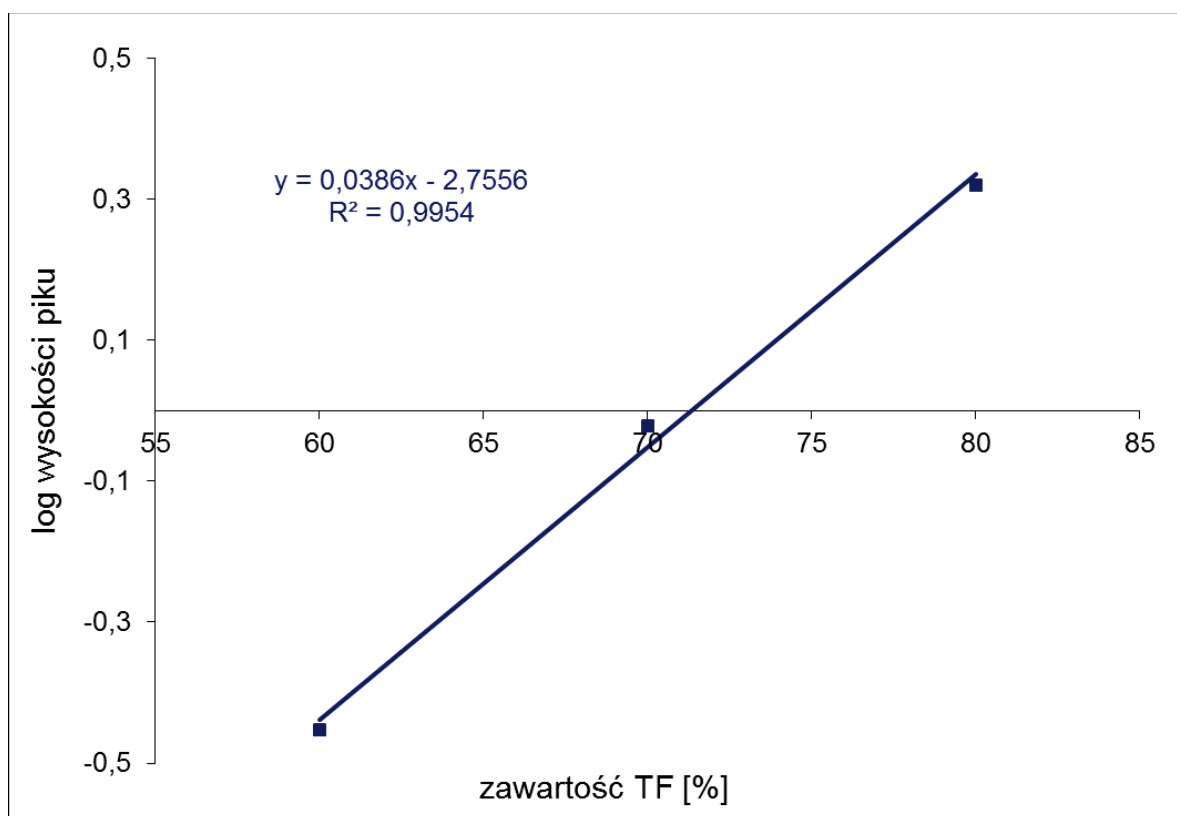
Korzystając z krzywych DSC, obliczono entalpię topnienia TF w mieszaninach substancji czynnej z laktozą i stearynianem magnezu. Pik topnienia TF występuje jedynie w przypadku mieszanin zawierających substancję czynną w zakresie stężeń 60-80%. Liniowość metody w tym zakresie jest zadowalająca ($r = 0,9991$), jednak zakres liniowości jest bardzo ograniczony (Rys. 17). Nie mają w tym przypadku zastosowania LOD i LOQ obliczone z

wykorzystaniem błędu standardowego, ponieważ wartości te znajdują się w zakresie stężeń TF, dla którego pik topnienia nie był widoczny.

Korzystając z równania regresji zamieszczonego w Tabeli 15, obliczono zawartość TF w preparatach handlowych zawierających więcej niż 60% substancji czynnej w masie tabletkowej (Tabela 16). Uzyskane wyniki odbiegały od wartości deklarowanej przez producenta o 9,99-14,2%. W związku z powyższym wyniki te nie są zgodne z wymaganiami farmakopealnymi.

Tabela 16. Wyniki oznaczenia TF, z wykorzystaniem krzywej kalibracji, w handlowych preparatach farmaceutycznych, zawierających laktozę jako substancję pomocniczą.

Preparat	Zawartość	Wynik oznaczenia		Wynik oznaczenia	
	TF w tabletkach [g]	TF na podstawie entalpii topnienia [g]	Różnica [%]	TF na podstawie wysokości pików [g]	Różnica [%]
Euphyllin long 200	0,2	0,2200	9,99	0,2321	16,04
Euphyllin long 300	0,3	0,3417	13,88	0,3313	10,44
Theoplus 100	0,1	0,1131	13,06	0,1028	2,80
Theoplus 300	0,3	0,3426	14,19	0,3142	4,72



Rys. 18. Zależność logarytmu wysokości pików topnienia TF od jej zawartości w mieszaninie z laktozą i stearynianem magnezu.

Kalibracja na podstawie wysokości pików DSC

Zależność wysokości pików topnienia TF od zawartości substancji czynnej w mieszaninie, w zakresie stężeń 60-80%, nie jest liniowa. Linearyzację krzywej uzyskano przez logarytmowanie wysokości pików TF, co przedstawia Rys. 18 ($r = 0,9977$). Również w tym przypadku nie mają zastosowania wartości LOD i LOQ obliczone na podstawie błędu standardowego, ponieważ obejmują zakres stężeń, w którym brak jest pików DSC, związanego z topnieniem substancji leczniczej.

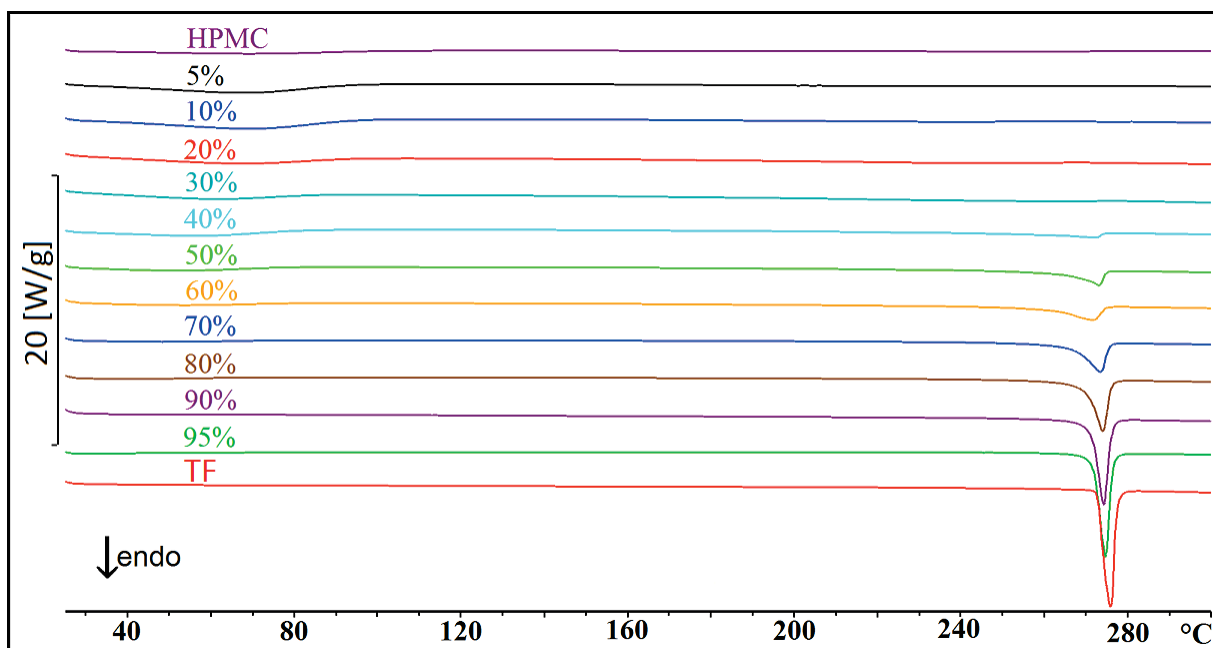
Wyniki oznaczeń, porównane z wartościami deklarowanymi przez producenta stanowiły od 102,8 do 116,04% wartości oczekiwanych (Tabela 16). W związku z powyższym można stwierdzić, że wysokość pików DSC związanego z topnieniem TF nie jest przydatna do analizy ilościowej tej substancji czynnej, ponieważ zgodność wyników z wartościami oczekiwany jest przypadkowa.

Matryca z HPMC

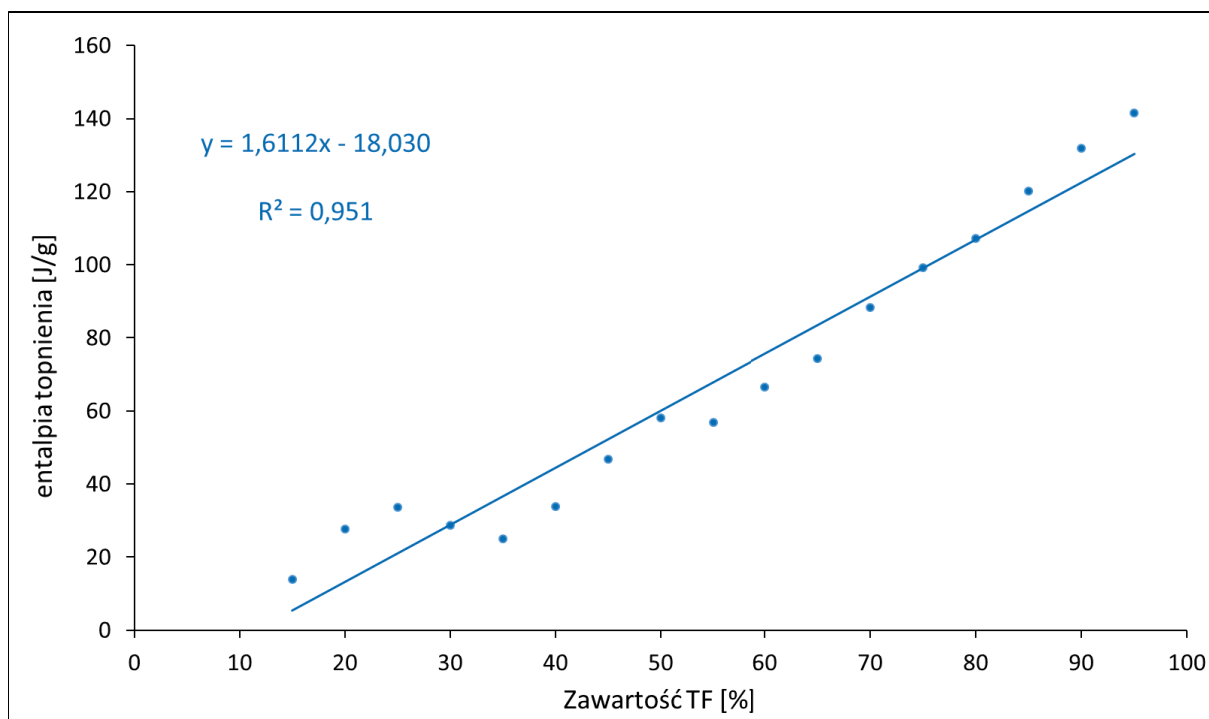
Kalibracja na podstawie entalpii topnienia

Analizowano mieszaniny TF z HPMC w zakresie stężeń 5-95% substancji czynnej, sporządzone przez homogenizację składników kartą celuloidową. W przypadku wszystkich mieszanin pik topnienia TF uległ poszerzeniu, a początek pików uległ przesunięciu w kierunku niższych temperatur. Na Rys. 19 przedstawiono krzywe DSC tych mieszanin. W przypadku mieszanin o zawartości TF poniżej 10%, nie wykryto pików topnienia substancji czynnej, natomiast na krzywych DSC mieszanin zawierających 15-25% substancji czynnej, pik ten był bardzo rozmyty. Krzywą zależności entalpii topnienia od zawartości substancji czynnej, przedstawiono na Rys. 20.

Analizie poddano również mieszaniny TF z HPMC w zakresie stężeń 0,5-50% substancji czynnej, sporządzone przez mieszanie składników pistlem w moździerzu. Na krzywych DSC tych mieszanin również obserwowano poszerzenie pików topnienia oraz jego przesunięcie w kierunku niższych temperatur, a w przypadku mieszanin zawierających poniżej 10% TF, nie wyodrębniono pików topnienia TF. Sporządzono krzywą zależności entalpii topnienia TF od jej zawartości w mieszaninie, przy czym współczynnik korelacji dla tej krzywej jest lepszy niż w przypadku mieszanin homogenizowanych kartą celuloidową (Tabela 17).



Rys. 19. Krzywe DSC mieszanin TF z HPMC, homogenizowanych kartą celuloidową.



Rys. 20. Krzywa zależności entalpii topnienia TF od jej zawartości w mieszaninie z HPMC, dla mieszanin homogenizowanych kartą celuloidową.

Mieszanki z HPMC i stearynianem magnezu

Kalibracja na podstawie entalpii topnienia

Badano również mieszaniny TF z HPMC z dodatkiem stearynianu magnezu, w zakresie stężeń 50-95% substancji czynnej, otrzymane przez mieszanie składników pistlem w moździerzu. Pik topnienia był obecny na wszystkich krzywych DSC tych mieszanin. Obliczono

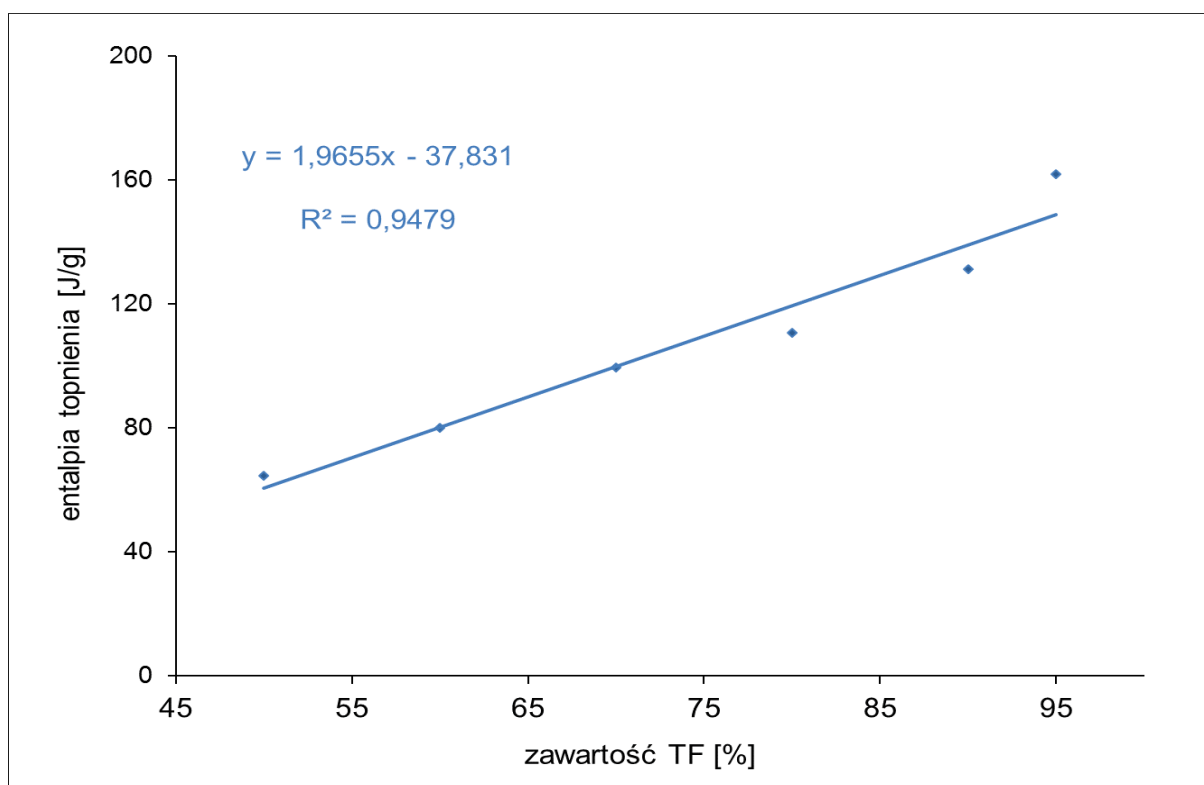
entalpię topnienia TF i wykreślono ją w funkcji zawartości substancji czynnej. Granice wykrywalności i oznaczalności obliczone na podstawie tej krzywej kalibracji są nieznacznie wyższe w porównaniu z wartościami LOD i LOQ obliczonymi dla krzywej opracowanej dla mieszanin bez dodatku stearynianu magnezu, homogenizowanych kartą celulozową oraz około dwukrotnie wyższe w porównaniu z wartościami LOD i LOQ uzyskanymi dla krzywej mieszanin homogenizowanych z użyciem pistla.

W Tabeli 17 zestawiono parametry regresyjne uzyskane dla wszystkich mieszanin TF z HPMC. Wysoka i ujemna wartość wyrazu wolnego w równaniach regresji wskazuje na wystąpienie niezgodności między składnikami, związanej prawdopodobnie z utratą krystaliczności przez część substancji czynnej.

Różne sposoby przygotowania mieszanin HPMC, poprzez homogenizację składników pistlem w młynku lub za pomocą karty celulozowej, nie doprowadziły do uzyskania zadowalających krzywych kalibracji. Wynika z tego, iż obecność HPMC w warunkach podwyższonej temperatury wpływa niekorzystnie na krystaliczność TF, niezależnie od sposobu mieszania składników.

Tabela 17. Parametry regresyjne krzywych kalibracji oraz granice wykrywalności i oznaczalności metod oznaczania TF w mieszaninach z HPMC.

Parametr	Entalpia topnienia TF		Wysokość pików	
	HPMC		HPMC z dodatkiem stearynianu magnezu	
	Mieszanie pistlem	Mieszanie kartą celulozową	Mieszanie pistlem	Mieszanie pistlem
Zawartość teofiliny w mieszaninach [%]	10-50	15-95	50-95	50-95
$a \pm \Delta a$	4,72±1,33	1,61±0,30	4,72±0,99	0,059±0,004
S_a	0,31	0,07	0,23	0,001
$b \pm \Delta b$	-19,97±43,55	-20,86±18,03	-37,83±75,22	-2,26±0,43
S_b	10,12	4,19	17,48	0,10
r	0,9938	0,9862	0,9736	0,9990
S_{xy}	9,65	7,03	8,98	0,05
LOD [%]	6,75	14,45	15,08	2,86
LOQ [%]	20,46	43,78	45,71	8,67
Zakres metody [%]	20,5-50,0	43,8-95,0	45,7-95,0	8,7-95,0



Rys. 21. Zależność entalpii topnienia TF od jej zawartości w mieszaninach z HPMC i stearynianem magnezu.

Tabela 18. Wyniki oznaczenia TF, z wykorzystaniem krzywej kalibracji, w handlowych preparatach farmaceutycznych, zawierających pochodne celulozy jako substancje pomocnicze.

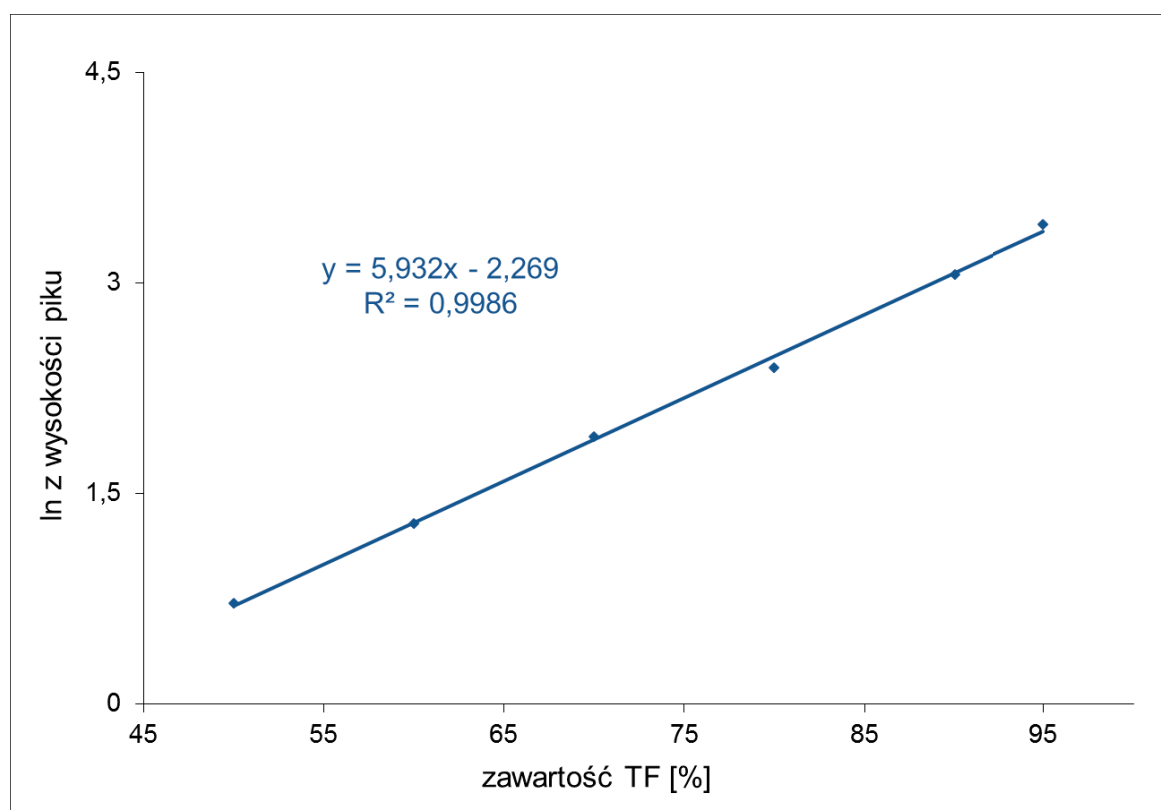
Preparat	Zawartość		Wynik oznaczenia		
	TF w tabletkach [g]	TF na podstawie entalpii topnienia [g]	Różnica [%]	TF na podstawie wysokości piku [g]	Różnica [%]
Afonilum SR 375	0,375	0,3951	5,37	0,2681	-28,51
Theospirex retard 150	0,15	0,1451	-3,30	0,1097	-26,87
Theospirex retard 300	0,30	0,2976	-0,80	0,2165	-27,83
Theovent 300	0,3	0,3028	0,93	0,2903	-3,24

Analizie poddano preparaty handlowe TF, które w swoim składzie zawierały pochodne celulozy jako substancje pomocnicze. Z otrzymanych krzywych DSC wyznaczono entalpię topnienia TF. Korzystając z krzywej kalibracji, opracowanej w zakresie stężeń 50-95% TF w mieszaninach z HPMC z dodatkiem stearynianu magnezu (Tabela 17, Rys. 21), obliczono zawartość TF w preparatach.

Jedynie dla preparatu Afonilum SR 375 uzyskano wynik różniący się od wartości deklarowanej o więcej niż 5%, ale różnica była niewielka (Tabela 18). Dla pozostałych preparatów uzyskano zadowalające wyniki w odniesieniu do wymogów farmakopealnych.

Kalibracja na podstawie wysokości pików DSC

Opracowano krzywą zależności wysokości pików topnienia TF od jej zawartości w mieszaninach z HPMC i stearynianem magnezu, w zakresie od 50 do 95% zawartości substancji czynnej ($r = 0,9312$). W celu poprawienia liniowości krzywej, wykreślono ją w formie wykładniczej (Rys. 22; $r = 0,9990$). Parametry regresyjne krzywej zestawiono w Tabeli 17.

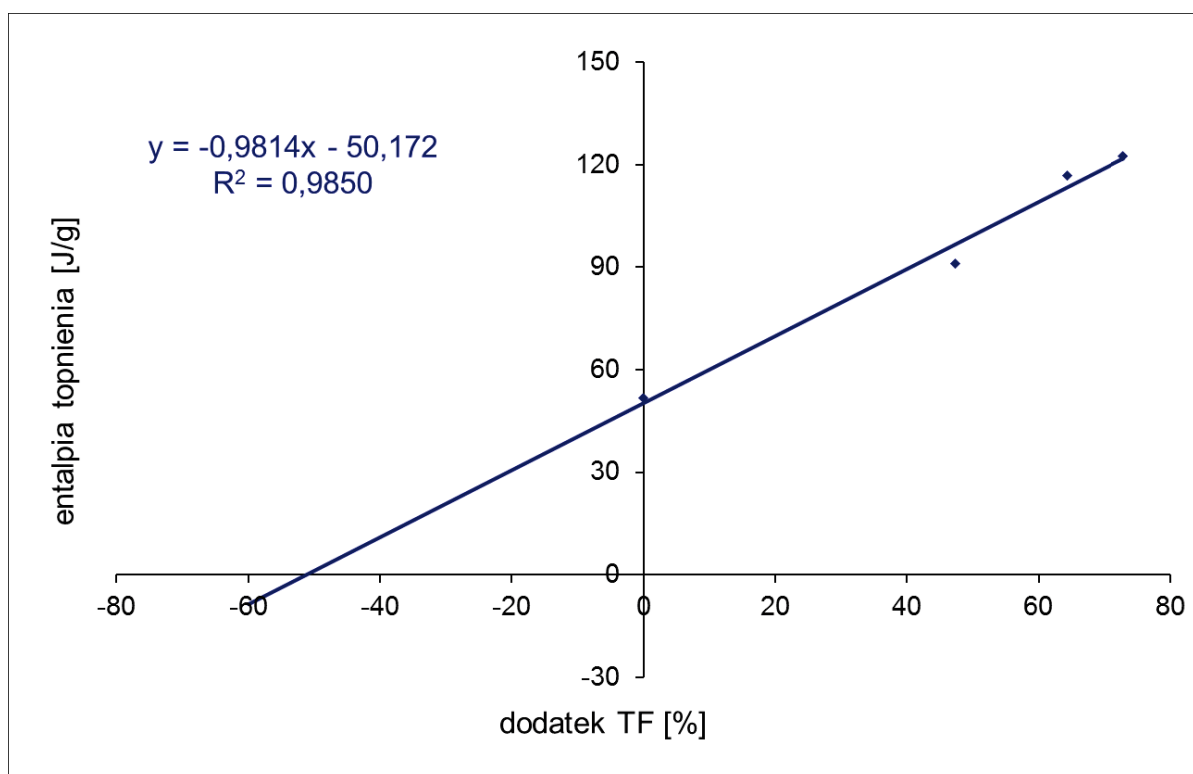


Rys. 22. Zależność wykładnicza wysokości pików TF od jej zawartości w mieszaninach z HPMC i stearynianem magnezu.

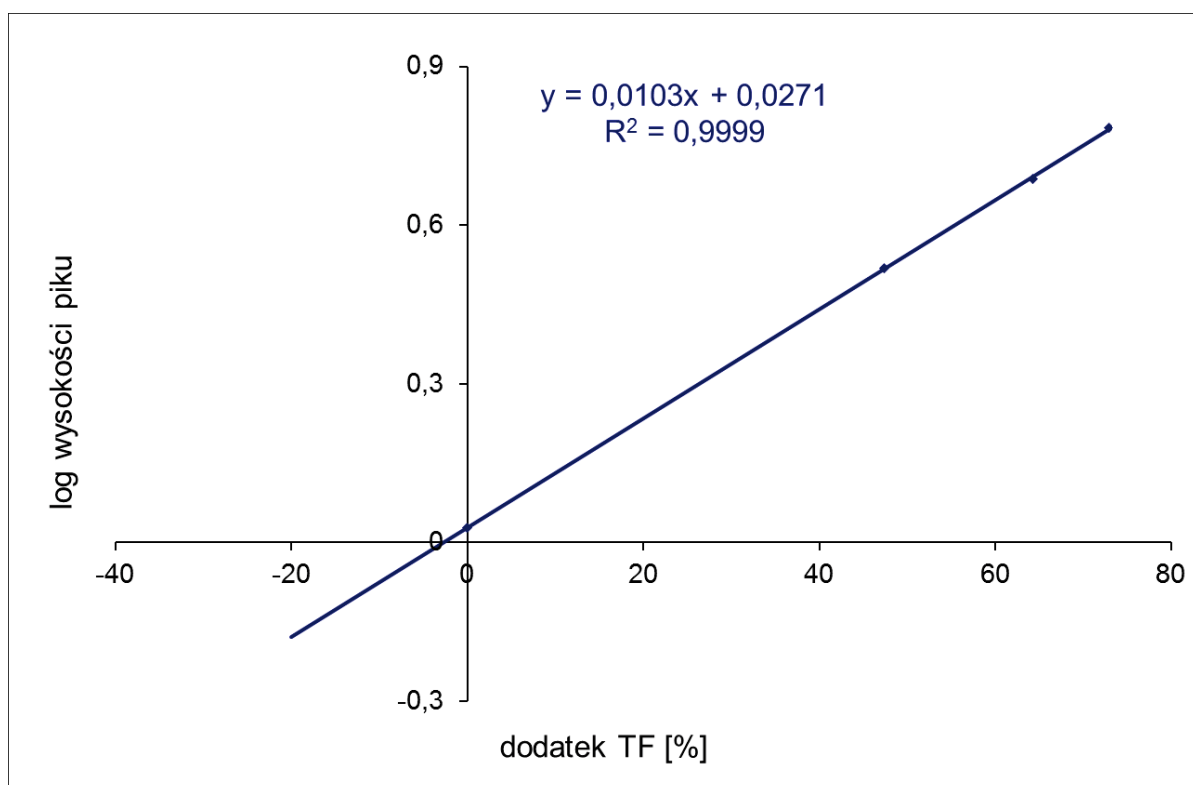
Z krzywych DSC preparatów TF z pochodnymi celulozy jako substancjami pomocniczymi odczytano wysokości pików i korzystając z zależności wykładniczej obliczono zawartość TF w preparatach (Tabela 18). Dla większości analizowanych produktów, wyniki oznaczeń różniły się od wartości oczekiwanej o więcej niż 5%.

Metoda dodatku wzorca

Pozytywne wyniki oznaczeń zawartości TF w produktach farmaceutycznych na podstawie entalpii topnienia lub wysokości endotermicznego piku DSC związanego z topnieniem substancji czynnej są dziełem przypadku. Badając powyższe mieszaniny zaobserwowano istotny wpływ matrycy na wyniki oznaczeń. Obecność substancji pomocniczych powodowała zanik endotermicznego piku DSC związanego z topnieniem substancji czynnej, szczególnie przy niskiej jej zawartości. W sytuacji, gdy zachodzi podejrzenie wpływu matrycy na wynik oznaczenia, wpływ ten zminimalizować można przez kalibrację metodą dodatku wzorca. Oceniono więc przydatność tej metody do oznaczania zawartości TF w preparatach handlowych.



Rys. 23. Oznaczenie TF w preparacie Theovent 100 na podstawie powierzchni piku DSC, metodą wielokrotnego dodatku wzorca.



Rys. 24. Oznaczenie TF w preparacie Theovent 100 na podstawie wysokości piksu DSC, metodą wielokrotnego dodatku wzorca.

Na Rys. 23 i 24 przedstawiono wyniki oznaczeń TF w preparacie Theovent 100, korzystając z powierzchni i wysokości piksu topnienia substancji aktywnej. Wyniki uzyskane dla badanych preparatów porównano z wartościami deklarowanymi przez producenta. Odchylenia od wartości deklarowanej były znaczne. Jedynie w przypadku preparatu Theovent 100, korzystając z entalpii topnienia, uzyskano wynik spełniający wymagania FP VI.

Wbrew oczekiwaniom, stosując metodę wielokrotnego dodatku wzorca uzyskano wyniki dużo mniej zadowalające niż metodą krzywej kalibracji. Nie udało się wyeliminować ani zminimalizować wpływu matrycy na wynik oznaczenia.

1.5 Podsumowanie

Przydatność DSC w analizie ilościowej okazała się, na przykładzie badanych substancji i preparatów, bardzo ograniczona. Poszukiwanie zależności wysokości piksu topnienia od zawartości substancji aktywnej nie doprowadziło do zadowalających wyników. Zależność ilościową oparto na proporcjonalnej zależności entalpii topnienia substancji czynnej do jej zawartości w mieszaninie. Dla większości mieszanin uzyskano liniową zależność, jednak w wielu przypadkach zakres liniowości był ograniczony, a krzywa kalibracji nie przechodziła przez początek układu współrzędnych. Prowadzi to do wniosku, iż zastosowana procedura analityczna obciążona jest błędem systematycznym, którego powodem może być utrata

krystaliczności przez część substancji czynnej w trakcie przygotowania próbki lub jej analizy [77,80]. Stanowi to istotne ograniczenie DSC w analizie ilościowej.

Utrata krystaliczności substancji aktywnej może być spowodowana oddziaływaniami zachodzącymi pomiędzy składnikami mieszanin, prowadzącymi do wytworzenia nowych połączeń. Możliwe są również oddziaływania fizyczne, np. tworzenie mieszaniny eutektycznej, wzajemne rozpuszczanie składników lub przemiany fazowe zachodzące w wyniku kontaktu substancji czynnej z pomocniczą. Prawdopodobieństwo zainicjowania interakcji pomiędzy składnikami jest większe, gdy homogenizacja mieszanin prowadzona jest z użyciem pistla i moździerza [155,156]. Delikatne mieszanie próbek za pomocą karty celuloidowej pozwoliło w niektórych przypadkach uzyskać mniejsze przesunięcie krzywej kalibracji względem początku układu współrzędnych, jednak nie zniwelowało go całkowicie.

Dla wielu badanych mieszanin obserwowano nieznaczne przesunięcie pików topnienia w kierunku niższych temperatur oraz ich poszerzenie, co może być spowodowane wystąpieniem oddziaływań o charakterze fizycznym pomiędzy składnikami mieszanin.

Przydatność DSC do analizy ilościowej produktów farmaceutycznych badanych w ramach niniejszej pracy, okazała się wątpliwa. Metodą krzywej kalibracji uzyskano wyniki, których zgodność z wartościami deklarowanymi przez producenta była przypadkowa. Zastosowanie metody dodatku wzorca, które miało na celu zminimalizowanie wpływu matrycy na wynik oznaczenia, również nie doprowadziło do uzyskania zadowalających wyników. Przyczyną niepowodzeń w oznaczeniach ilościowych mogą być także znaczne różnice w składzie jakościowym i ilościowym mas tabletkowych, stanowiących matrycę w próbkach handlowych preparatów farmaceutycznych.

W celu zbadania, jaki charakter mają interakcje pomiędzy składnikami mieszanin, przeprowadzono badania spektroskopowe FTIR oraz Ramana. Następnie przeprowadzono badania z użyciem termomikroskopu, w celu identyfikacji ewentualnych zmian w strukturze kryształów w kontakcie z polimerem. Opracowano również diagramy fazowe, umożliwiające ocenę prawdopodobieństwa wzajemnego rozpuszczania składników.

2. Metody spektroskopowe

Substancje lecznicze i pomocnicze oraz wszystkie sporządzone mieszaniny (Rys. 6) badano również z wykorzystaniem metod spektroskopowych FTIR i Ramana. Pierwsza z tych metod pozwala na identyfikację pasm absorpcji charakterystycznych dla wiązań z różnicą momentu dipolowego, czyli w szczególności wiązań w grupach funkcyjnych. Natomiast w

spektroskopii Ramana otrzymuje się pasma odpowiadające rozproszeniu światła, charakterystyczne dla wiązań bez różnicy momentu dipolowego, obrazujące głównie szkielet cząsteczki. Zastosowanie tych komplementarnych metod umożliwia wykrycie ewentualnych niezgodności o charakterze chemicznym. Pojawienie się bowiem w widmach mieszanin nowych pasm, których nie można przyporządkować do pasm w widmach substancji czynnej ani pomocniczej wskazuje na tworzenie się nowych połączeń.

Dodatkowo, wykorzystując metody spektroskopowe z zakresu podczerwieni możliwe jest potwierdzenie formy polimorficznej substancji badanej [157,158,159]. Występują bowiem niewielkie różnice w położeniu lub intensywności pasm absorpcji w widmach FTIR różnych form, co wynika z oddziaływań pomiędzy cząsteczkami w monokryształach, np. tworzenia się wiązań wodorowych. Możliwe jest również zaobserwowanie niewielkich różnic w położeniu oraz intensywności i kształcie pasm absorpcji, jeśli pomiędzy składnikami badanych mieszanin występują oddziaływania fizyczne (wiązania wodorowe, siły van der Waalsa, wiązania π - π). Również w widmie Ramana obserwuje się niewielkie różnice w położeniu pasm, w zależności od formy polimorficznej lub oddziaływań pomiędzy cząsteczkami, co związane jest z wpływem grup funkcyjnych na kształt szkieletu cząsteczki [159,160]. Ponadto, wykorzystanie mieszanin o różnych proporcjach składników umożliwia wykrycie niezgodności zależnych od stężenia, przez określenie, przy jakim stężeniu substancji leczniczej charakterystyczne pasma nie będą pojawiać się w badanym widmie lub zmieniają swoje położenie.

Cząsteczki PAR zdolne są do tworzenia wiązań wodorowych, ponieważ posiadają w swojej strukturze ugrupowania -NH oraz -OH, w których atomy wodoru podatne są na tworzenie takich połączeń [157,160]. Opisano również zjawisko tworzenia dwóch rodzajów wiązań wodorowych pomiędzy cząsteczkami PAR w kryształach. Pierwszy rodzaj wiązań dotyczy wiązań pomiędzy atomem wodoru z grupy -NH i tlenem z ugrupowania -OH, natomiast drugi pomiędzy wodorem z grupy -OH i tlenem w ugrupowaniu karboksamidowym.

Podobnie, ASA posiada w swojej strukturze grupę karboksylową, zdolną do tworzenia wiązań wodorowych. Jako forma krystaliczna, ASA występuje formie dimerów połączonych grupami karboksylowymi tworzącymi wiązania wodorowe pomiędzy atomami wodoru z grupy -OH i tlenu z wiązania C=O [161,162].

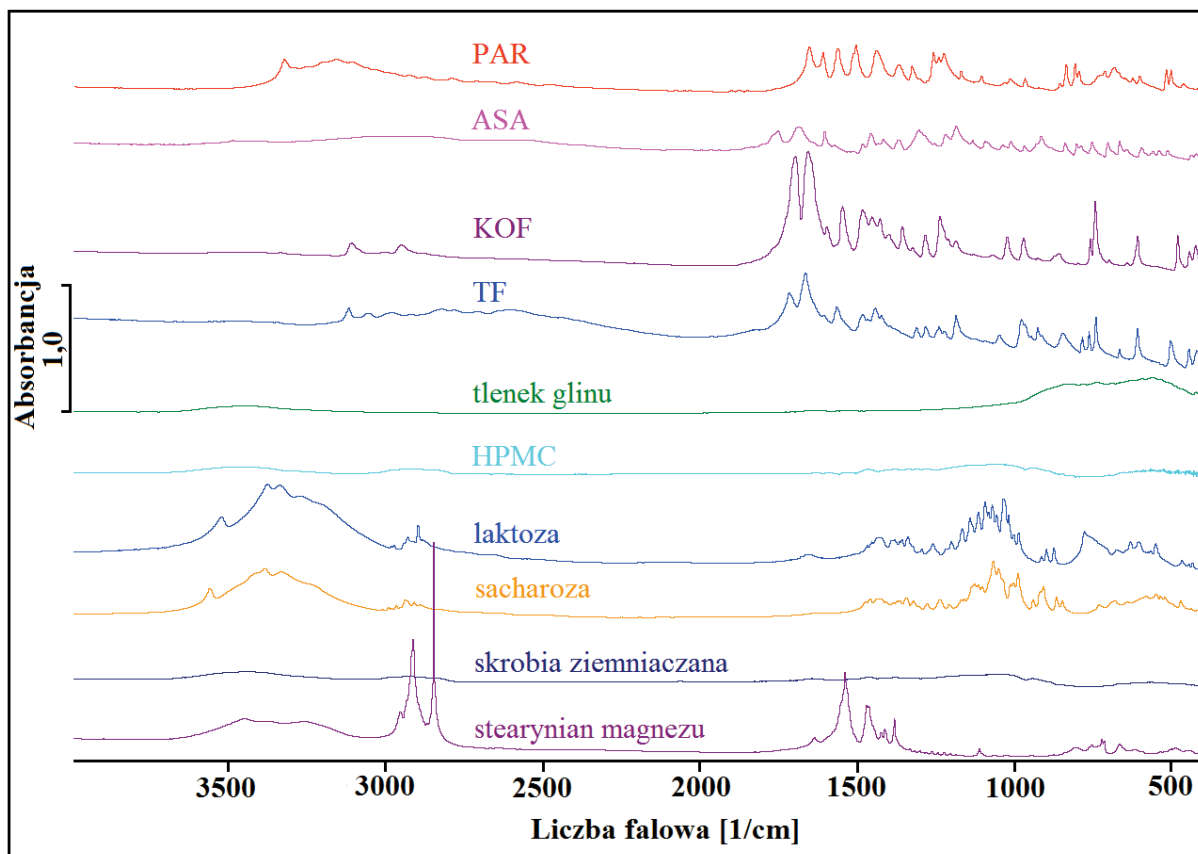
W metyloksantynach występują grupy amidowe oraz atom azotu w pierścieniu imidazolowym, które mogą być donorami elektronów do wytworzenia wiązań wodorowych. Dodatkowo, ugrupowania metylowe mogą być akceptorami wolnej pary elektronowej. TF i KOF są więc zdolne do tworzenia wiązań wodorowych [163,164].

Również w przypadku HPMC opisano zjawisko tworzenia wiązań wodorowych pomiędzy grupą –OH, a tlenem z wiązania C=O w grupie karboksylowej [165]. Autorzy opracowania wskazują na niewielkie różnice w położeniu pasm absorpcji, związane z wytworzeniem tych wiązań, oraz na wynikające z takich oddziaływań obniżenie temperatury przemian fazowych. W związku z tym spodziewano się, że w widmach spektroskopowych mieszanin substancji czynnych z HPMC możliwe będzie zaobserwowanie niewielkich różnic w położeniu pasm, które będzie można utożsamić z tworzeniem wiązań wodorowych pomiędzy składnikami.

2.1 Spektroskopia FTIR

Widma FTIR badanych substancji przedstawiono na Rys. 25. Poszczególnym elementom struktury substancji leczniczych przypisano charakterystyczne dla nich pasma absorpcji i zestawiono je w Tabelach 19-22 wraz z odniesieniem do danych literaturowych. Charakterystyczne pasma umożliwiają potwierdzenie obecności PAR, ASA, KOF i TF w mieszaninach z substancjami pomocniczymi.

Interpretacja wszystkich widm FTIR badanych mieszanin wykazała, że pasma absorpcji charakterystyczne dla poszczególnych substancji leczniczych obecne były we wszystkich widmach mieszanin tych substancji z tlenkiem glinu oraz prawie we wszystkich widmach z wybranymi substancjami pomocniczymi. Intensywność pasm malała wraz ze zmniejszającym się udziałem substancji czynnej w mieszaninie. Przy niskiej zawartości substancji aktywnych (poniżej 10%) intensywność pasm była niewielka, co istotnie utrudniało interpretację. Dla przykładu zestawienie opisanych w literaturze pasm absorpcji dla form I i II PAR w porównaniu do pasm absorpcji uzyskanych dla PAR oraz jego mieszanin z HPMC, zawierających 10, 30, 50, 70 oraz 90% substancji czynnej, sporządzonych przez homogenizację mieszanin kartą celulozową, przedstawiono w Tabeli 23. Uzyskane pasma są charakterystyczne dla I formy krystalicznej PAR. Liczby falowe charakterystyczne dla tej formy krystalicznej zapisano pogrubioną czcionką. Dodatkowo, brak przesunięć pasm dowodzi, że nie zachodzą oddziaływania fizyczne pomiędzy składnikami mieszanin.



Rys. 25. Widma FTIR badanych substancji leczniczych i pomocniczych.

Tabela 19. Charakterystyczne pasma PAR w widmach FTIR i Ramana.

PAR					
Badania własne	Pasma FTIR [cm ⁻¹]		Badania własne	Pasma Ramana [cm ⁻¹]	
	Dane literaturowe [158,160]	Opis charakterystycznych pasm [158,160]		Dane literaturowe [158,160]	Opis charakterystycznych pasm [158,160]
503	504	Y Ph-amid	212	218	
518	520	Y Ph-amid	327	326	χ Ph
604	604	χ Ph, χ amid	389	388	
625	624	χ Ph, χ amid	463	362	χ Ph
648	650	δ Ph, δ amid	502	501	χ Ph
685	668	χ CNH χ PhH	649	649	ρ Ph
713	715	χ CNH χ PhH	795	796	v Ph
731	730	χ PhH	832	839	χ CH
796	795	δ Ph, δ amid	856	856	v CH w Ph
808	810	δ Ph, δ amid	1167	1169	ρ CH w Ph
837	837	χ PhH	1235	1237	v CN
857	856	χ PhH	1276	1278	kombinacja OH i CO
925	924	χ PhH	1322	1324	χ CH
968	968	δ PhH, v CN	1369	1371	δ (parasolowe) CH ₃
1015	1015	δ PhH, δ COH	1560	1559	v NH, v C=O
1107	1107	δ PhH, δ CH ₃	1609	1611	δ NH
1172	1172	δ PhH, δ COH	1646	1649	v C=O
1226	1227	δ PhH, v CC	2930	2937	v s CH ₃
1259	1260	δ PhH, v CN	3063	3058	v s CH ₃
1327	1327	δ CH ₃	3102	3110	v a CH
1370	1371	δ CH ₃ , v Ph			
1441	1442	δ CH ₃ , v Ph			
1506	1506	δ CNH, v Ph			
1564	1565	δ CNH, v Ph			
1611	1610	v Ph			
1655	1653	v C=O, δ CNH			
2927	2926	v CH ₃			
3034	3032	v PhH			
3161	3161	v PhH			
3325	3327	v OH			

Ph – pierścień aromatyczny;

Drgania: v - rozciągające, δ - deformacyjne, χ - zginające poza płaszczyznę, ρ - zginające w płaszczyźnie, Y - związane ze zmianą kąta dwuściennego pomiędzy płaszczyznami, s - symetryczne, a – antysymetryczne.

Tabela 20. Charakterystyczne pasma ASA w widmach FTIR i Ramana.

ASA					
Badania własne	Pasma FTIR [cm ⁻¹]		Badania własne	Pasma Ramana [cm ⁻¹]	
	Dane literaturowe [166]	Opis charakterystycznych pasm [166]		Dane literaturowe [166]	Opis charakterystycznych pasm [166]
561	563	μ A COOH,	172	171	χ S Ph-COOH
643	645	χ A CC w Ph	292	291	χ S Ph-OCOCH ₃
667	667	ρ A O-C=O, ρ A CC w Ph	323	323	ρ S C-C(COOH)-C
704	705	ρ A O-C=O, ρ A COOH n	426	425	ρ S O-CO-CH ₃ n
754	755	χ A CH w Ph,	552	551	χ S CC Ph, χ S CO- CH ₃ n
789	790	χ A CH w Ph,	705	705	χ S CH Ph, ρ S CC Ph
804	804	χ A COOH	751	751	χ S CH Ph
840	840	ρ A COOH n, ρ A CC w Ph, χ A CH w Ph	785	785	χ S CH Ph, χ S COOH
969	970	χ A CH w Ph	1154	1154	ρ S CH Ph
1013	1014	ρ A O-CO-CH ₃ , ρ aA CH ₃	1192	1191	v aS O-CO-CH ₃ , ρ aS CH ₃
1094	1090	χ A O-CO-CH ₃ , ρ aA CH ₃	1294	1293	ρ S OH, v S CC Ph
1134	1135	ρ A CH Ph,	1606	1606	v S CC Ph
1187	1187	v A CC Ph	2943	2942	v sS CH m
1221	1221	ρ A CH Ph	3078	3077	v s CH Ph
1256	1256	v A Ph-OCOCH ₃ ,	3093	3092	v s CH Ph
1306	1306	ρ A CH Ph			
1419	1420	ρ A OH,			
1484	1484	v A CC Ph			
1574	1575	ρ A OH			
1605	1606	v A CC Ph,			
1689	1691	ρ A CH Ph,			
1754	1754	ρ A OH			
3024	3024	v A C=O k, ρ A OH			
		v A C=O e			
		v A CH Ph			

Ph - pierścień aromatyczny, k - grupa karboksylowa, e - grupa estrowa, m - grupa metylowa

Drgania: v - rozciągające, δ - deformacyjne, χ - zginające poza płaszczyzną, ρ - zginające w płaszczyźnie, μ - kołyszące w płaszczyźnie, τ - kołyszące poza płaszczyzną, n - nożycowe, a - antysymetryczne, s - symetryczne, A - antysymetryczne w dimerze, S - symetryczne w dimerze.

Tabela 21. Charakterystyczne pasma KOF w widmach FTIR i Ramana.

KOF					
Pasma FTIR [cm ⁻¹]			Pasma Ramana [cm ⁻¹]		
Badania własne	Dane literaturowe [167]	Opis charakterystycznych pasm [167]	Badania własne	Dane literaturowe [167]	Opis charakterystycznych pasm [167]
481	481	δ a C-N-C	226	225	δ N-C-N
610	611	δ C=C-C	442	444	δ N-C-C
745	743	δ O=C-C	481	488	δ a C-N-C
860	862	δ N=C-H	553	556	δ C-N-CH ₃
973	973	ν N-CH ₃	641	645	δ C=C-N
1025	1025	ν a N-CH ₃	739	745	δ C=C-C
1188	1189	ν CC, ν a CN	799	800	δ N-C-H
1239	1237	ν CN	925	925	ν s N-CH ₃
1286	1285	ν CN	1019	1020	ν a N-CH ₃
1549	1548	ν a C=O	1240	1241	ν CN
1598	1600	ν C=C	1282	1288	ν CN
1659	1660	ν a C=O	1326	1331	ν CN
1699	1700	ν C=N	1598	1600	ν C=C
2953	2954	ν CH	1654	1656	ν a C=O
			1696	1700	ν C=N
			2958	2963	ν CH

Drgania: ν - rozciągające, δ - deformacyjne, a - antysymetryczne.

Tabela 22. Charakterystyczne pasma TF w widmach FTIR i Ramana.

TF					
Pasma FTIR [cm ⁻¹]			Pasma Ramana [cm ⁻¹]		
Badania własne	Dane literaturowe [167]	Opis charakterystycznych pasm [167]	Badania własne	Dane literaturowe [167]	Opis charakterystycznych pasm [167]
446	450	δ N-C-C	444	450	δ a C-N-C
504	500	δ a C-N-C	552	550	δ C=C-C
610	615	δ C=C-N	608	610	δ C=C-N
667	670	δ O=C-N	664	660	δ O=C-N
742	744	δ O=C-C	762	760	δ O=C-C
848	850	δ C-N-H	925	920	δ N-C-N
927	925	ν s N-CH ₃	947	940	ν s N-CH ₃
979	980	ν a N-CH ₃	967	970	δ N=C-H
1241	1240	ν CN	1082	1088	ν s C-N
1284	1285	ν CN	1246	1244	ν C-N
1313	1310	ν CN	1284	1280	ν C-N
1567	1556	ν s C=O	1568	1570	ν s C=O
1667	1664	ν a C=O	1609	1613	ν C=C
1718	1710	ν C=N	1662	1663	ν a C=O
			1704	1706	ν C=N
			3121	3120	ν N-H

Drgania: ν - rozciągające, δ - deformacyjne, a - antysymetryczne, s - symetryczne.

Tabela 23. Pasma absorpcji: dane literaturowe dla form krystalicznych I i II oraz dla badanego PAR i jego mieszanin z HPMC.

PAR	PAR I	PAR II	90%	70%	50%	30%	10%
463	-	-	463	464	463	463	464
503	504	508	503	503	503	503	503
518	520	513	518	519	518	518	518
604	604	608	604	604	604	604	604
625	624	625	625	625	625	625	625
648	650	670	649	649	649	648	649
685	668	-	686	686	685	684	685
713	715	710	714	714	713	713	713
731	730	727	732	730	731	731	730
796	795	797	796	796	796	796	796
808	810	-	808	808	808	808	808
837	837	837	837	837	837	837	837
857	856	861	857	857	857	857	856
925	924	-	924	925	925	926	926
968	968	966	968	968	968	968	968
1015	1015	1015	1015	1015	1015	1015	1016
1107	1107	1106	1108	1108	1107	1108	1108
1172	1172	1169	1172	1172	1172	1172	1171
1226	1227	1120	1226	1226	1226	1226	1225
1243	-	1243	1243	1243	1243	1243	1242
1259	1260	1280	1260	1260	1259	1259	1259
1327	1327	1326	1327	1327	1327	1327	1327
1370	1371	1375	1370	1370	1370	1370	1371
-	-	1424	-	-	-	-	-
1441	1442	1454	1442	1442	1441	1442	1442
1506	1506	1513	1506	1506	1506	1506	1506
1564	1565	1559	1564	1565	1564	1564	1564
1611	1610	1610	1611	1610	1610	1610	1611
-	-	1622	-	-	-	-	-
1655	1653	1655	1655	1655	1654	1655	1655
-	-	1667	-	-	-	-	-
2927	2926	2940	2927	2927	2928	2928	2938
3034	3032	3041	3034	3035	3034	3034	3034
3161	3161	3205	3161	3161	3161	3161	3162
3325	3327	3327	3325	3325	3325	3325	3326

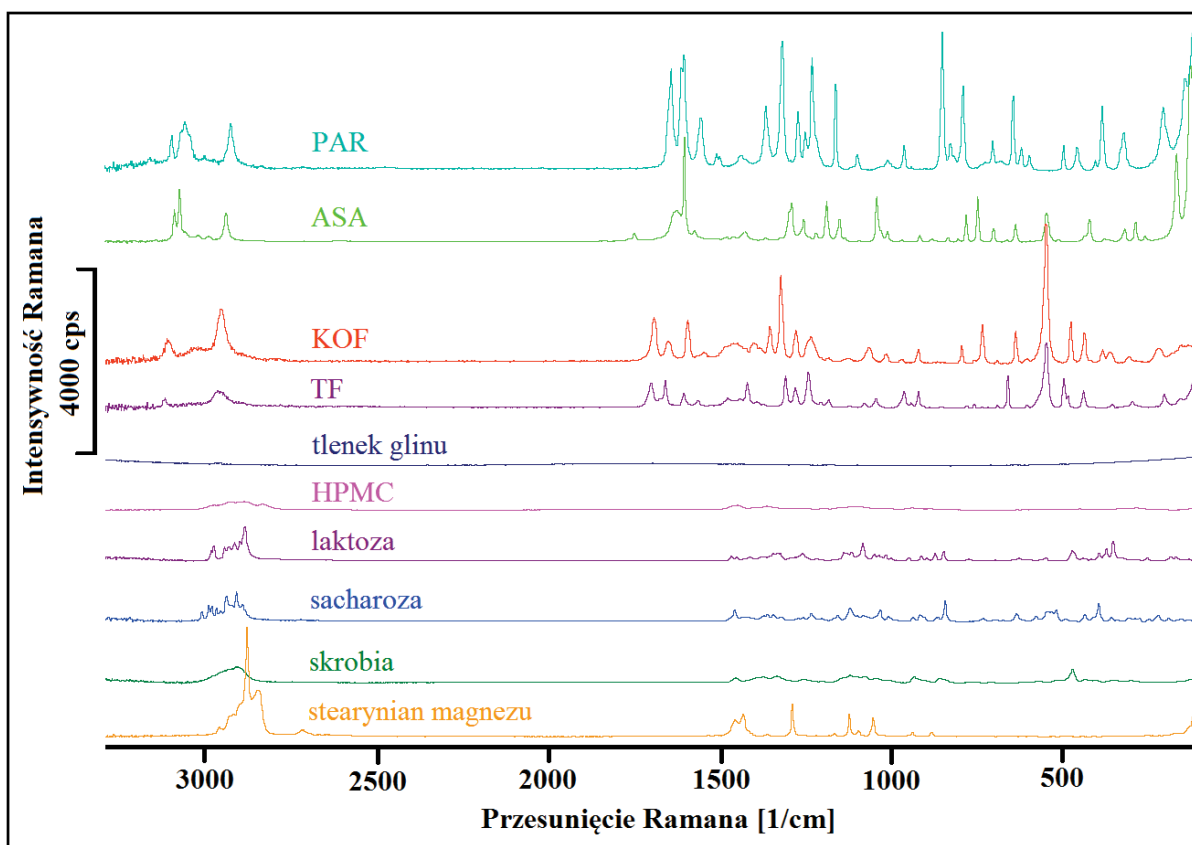
W przypadku większości badanych mieszanin potwierdzono obecność wszystkich pasm absorpcji substancji czynnej, bez przesunięcia pików lub pojawienia się pasm, których nie można byłoby przyporządkować składnikom mieszaniny. Wyjątek stanowią widma FTIR mieszanin ASA z HPMC, w przypadku których przy zawartości poniżej 20% substancji czynnej, nie było widoczne pasmo absorpcji przy 969 cm^{-1} , odpowiadające antysymetrycznym drganiom zginającym w płaszczyźnie grupy acetylowej. Może to wynikać z częściowej deacetylacji substancji leczniczej, która w warunkach podwyższonej temperatury w trakcie badania ulega intensyfikacji. Ponadto HPMC, jako substancja higroskopijna, może zawierać niewielkie ilości zaabsorbowanej wilgoci, co również może nasilać deacetylację.

Dodatkowo, porównanie widm mieszanin PAR z laktozą z widmami mieszanin PAR z laktozą i stearynianem magnezu wykazało, że w widmach mieszanin bez dodatku stearynianu magnezu intensywność pasm była większa, a pasma lepiej rozdzielone. Podobnej zależności nie obserwowano porównując intensywność pasm absorpcji mieszanin PAR z HPMC oraz PAR z HPMC i stearynianem magnezu.

2.2 Spektroskopia Ramana

Na Rys. 26 przedstawiono widma Ramana badanych substancji. Poszczególne elementy struktury substancji czynnych przypisano charakterystyczne dla nich pasma przesunięć Ramana. Pasma te zestawiono w Tabelach 19-22, odnosząc je do danych literaturowych, charakterystycznych dla poszczególnych wiązań w cząsteczkach.

W efekcie badań mieszanin substancji leczniczych z tlenkiem glinu i substancjami pomocniczymi stwierdzono obecność wszystkich pasm charakterystycznych dla substancji czynnych w większości widm. Intensywność pasm zmniejszała się wraz z malejącym udziałem substancji leczniczej w mieszaninie. Dla mieszanin zawierających mniej niż 10% substancji czynnych, intensywność pasm była niewielka, co niekiedy utrudniało ich interpretację. W żadnym z widm nie obserwowano pojawienia się nowych pasm. Dla przykładu zestawienie przesunięć Ramana pasm uzyskanych dla PAR i jego mieszanin z HPMC zawierających 10, 30, 50, 70 i 90 % substancji czynnej, w porównaniu z wartościami literaturowymi dla form I i II, PAR, przedstawiono w Tabeli 24. Dodatkowo, na podstawie pasm w widmie PAR potwierdzono, że badana substancja odpowiada formie I. Przesunięcia pasm Ramana, które charakteryzują tę formę polimorficzną zaznaczono pogrubioną czcionką. Za szczególnie charakterystyczne uważa się obecność pasma przy przesunięciu 463 cm^{-1} oraz brak pasma przy przesunięciu 454 cm^{-1} , które związane są z obecnością formy II [159].



Rys. 26. Widma Ramana badanych substancji leczniczych i pomocniczych.

2.3 Podsumowanie

Analiza widm FTIR i Ramana mieszanin substancji czynnych z pomocniczymi wskazuje na brak interakcji chemicznej pomiędzy większością badanych składników. Potwierdza to fakt, że w otrzymanych widmach nie obserwowano pojawiania się nowych pasm, które związane byłyby z utworzeniem nowych połączeń.

Korzystając z metod spektroskopowych, dla większości mieszanin nie stwierdzono również oddziaływań fizycznych, które spowodowałyby przesunięcia w położeniu pasm charakterystycznych dla substancji czynnych. Szczególną uwagę zwrócono na pasma charakterystyczne dla ugrupowań, które mogły brać udział w tworzeniu wiązań wodorowych pomiędzy substancjami leczniczymi i HPMC.

Wyjątek stanowią mieszaniny ASA z HPMC, dla których obserwowano zmiany wskazujące na częściową deacetylację substancji czynnej, którą może nasilać obecność HPMC.

Tabela 24. Pasma przesunięć Ramana: dane literaturowe dla form krystalicznych I i II oraz dla badanego PAR i jego mieszanin z HPMC.

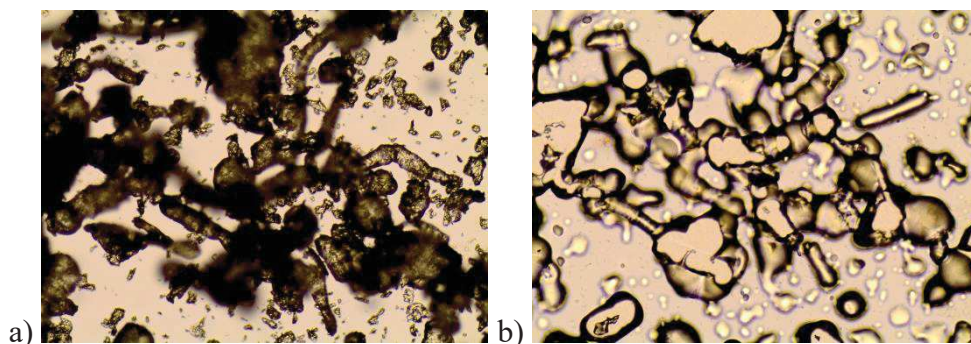
PAR	forma I	forma II	90%	70%	50%	30%	10%
212	218	-	212	212	211	211	212
327	326	330	327	327	326	326	325
389	388	388	389	389	389	388	388
463	362	452	463	462	463	462	463
502	501	505	502	502	501	501	501
649	649	649	649	649	649	649	649
795	796	796	795	795	795	795	795
832	839	-	832	832	832	832	832
856	856	856	855	855	855	855	855
1167	1169	1169	1167	1166	1166	1166	1166
-	-	1221	-	-	-	-	-
1235	1237	-	1235	1235	1235	1235	1235
1256	-	1245	-	-	-	-	-
1276	1278	1278	1276	1276	1276	1276	1275
1322	1324	1326	1322	1322	1322	1322	1322
1369	1371	1376	1369	1369	1369	1369	1369
1560	1559	-	1559	1560	1559	1559	1559
-	-	1578	-	-	-	-	-
1609	1611	1609	1609	1608	1608	1608	1608
-	-	1623	-	-	-	-	-
1646	1649	1649	1646	1646	1646	1646	1646
2930	2937	2940	2930	2930	2930	2930	2937
3063	3058	3069	3063	3064	3064	3064	3062
-	3072	-	-	-	-	-	-
3102	3110	3111	3101	3103	3100	3102	3102

3. Badania termomikroskopowe

Przeprowadzono badania substancji czynnych, HPMC oraz ich mieszanin sporządzonych przez homogenizację kartą celuloidową, przy użyciu termomikroskopu zaopatrzonego w kamerę. Pozwoliło to na obserwację zmian w wyglądzie kryształów charakterystycznych dla badanych substancji leczniczych oraz bezpostaciowych ziaren polimeru podczas ogrzewania.

3.1 Hypromeloza

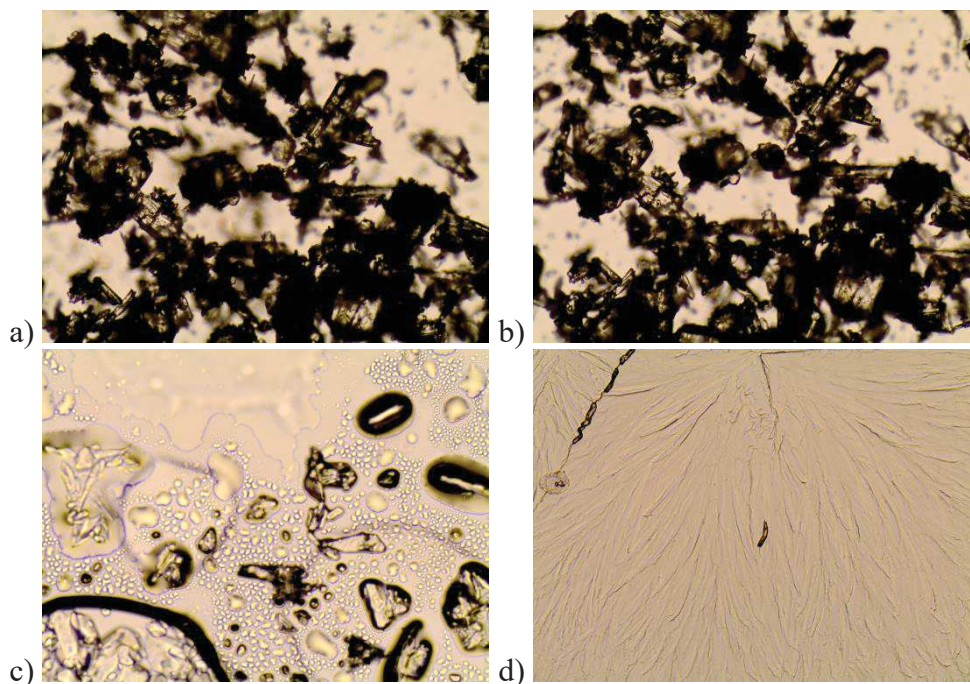
Na Fot. 1a przedstawiono wykonane pod mikroskopem (powiększenie 10x) zdjęcie HPMC, które odzwierciedla strukturę bezpostaciową polimeru. Widoczne są ziarna o bardzo zróżnicowanym kształcie, najczęściej owalne lub podłużne. Podczas ogrzewania próbki, w temp. ok. 100°C obserwowano pojawienie się pary, związanej prawdopodobnie z odparowaniem niewielkich ilości zaadsorbowanej wody. W temp. ok. 260°C widoczne było zeszklenie polimeru i brązowienie wynikające z postępującego rozkładu (Fot. 1b).



Fot. 1. Zdjęcia HPMC wykonane w temperaturach: a) 25°C i b) 270°C.

3.2 Paracetamol

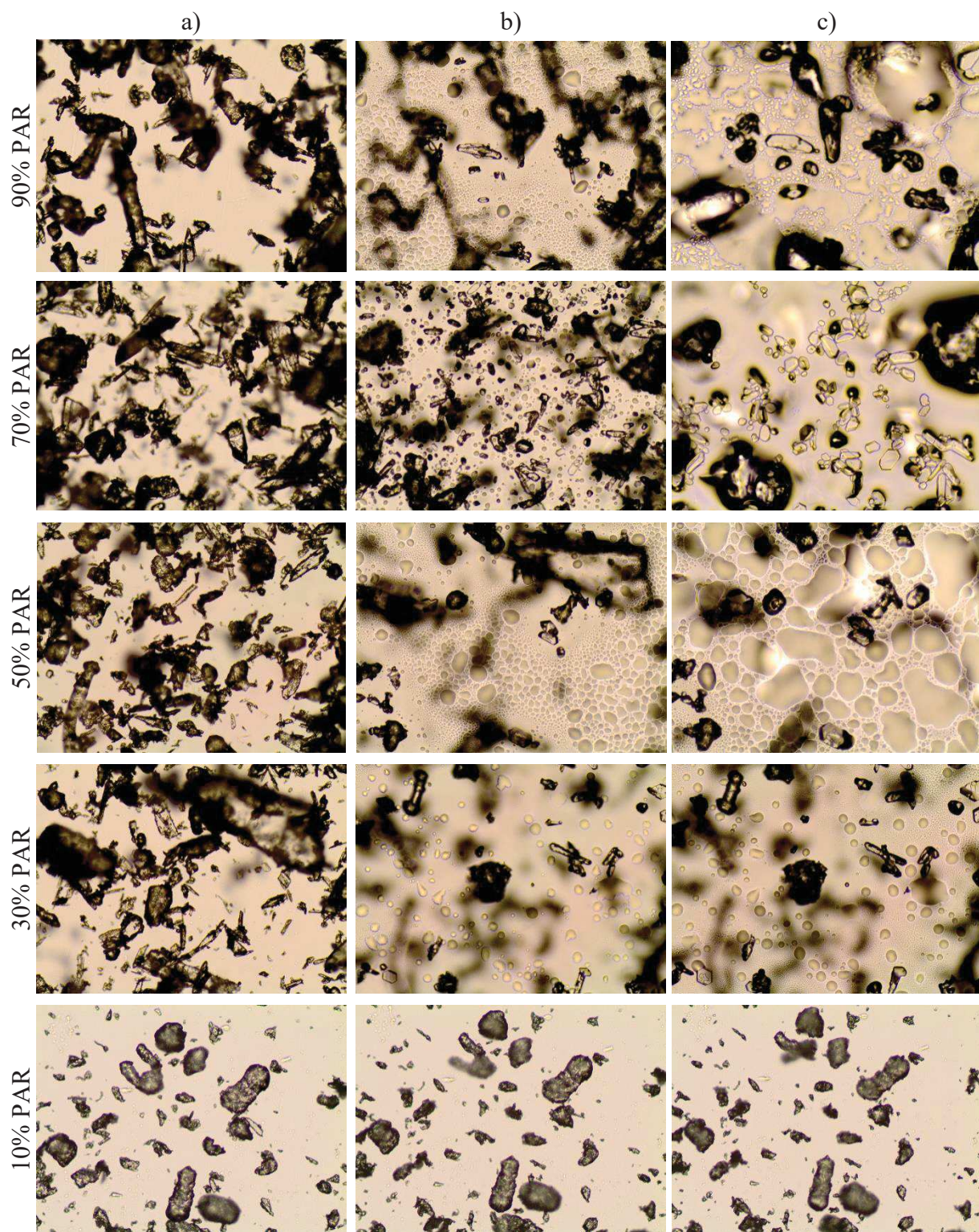
Na podstawie badań termomikroskopowych stwierdzono, że w zakresie temp. 25-172°C widoczne były kryształy PAR o regularnym kształcie i zróżnicowanej wielkości. W temp. powyżej 150°C obserwowano sublimację, natomiast w temp. ok. 168°C, topnienie drobnych kryształów PAR. W temp. powyżej 172°C występowała już jedynie forma ciekła PAR, intensywnie parująca. W trakcie chłodzenia próbki do temperatury pokojowej, nastąpiła krystalizacja substancji czynnej. Zdjęcia uzyskane na poszczególnych etapach badania przedstawiono na Fot. 2.



Fot.2. Zdjęcia termomikroskopowe PAR wykonane w temperaturach: 25°C (a), 156°C (b), 170°C (c) oraz po ochłodzeniu próbki do temperatury pokojowej (d).

Przeprowadzono również badania termomikroskopowe mieszanin PAR z HMPC, zawierających 10, 30, 50, 70 i 90% substancji czynnej. Na Fot. 3 przedstawiono zdjęcia tych mieszanin w temperaturach: pokojowej, 156°C oraz topnienia substancji leczniczej w mieszaninie. W początkowym etapie ogrzewania widoczne były wyraźne kryształy PAR oraz ziarna bezpostaciowej HPMC. Podobnie jak w przypadku substancji czynnej, w temp. ok. 150°C rozpoczęła się sublimacja. Topnienie najdrobniejszych kryształów rozpoczynało się w temperaturach niższych, w stosunku do temperatury topnienia PAR, tj. ok. 162, 161, 159, 157 i 156°C, odpowiednio dla mieszanin o malejącej zawartości PAR. Są to temperatury nieznacznie niższe od temperatur początku piku topnienia, uzyskanych dla tych mieszanin z wykorzystaniem DSC.

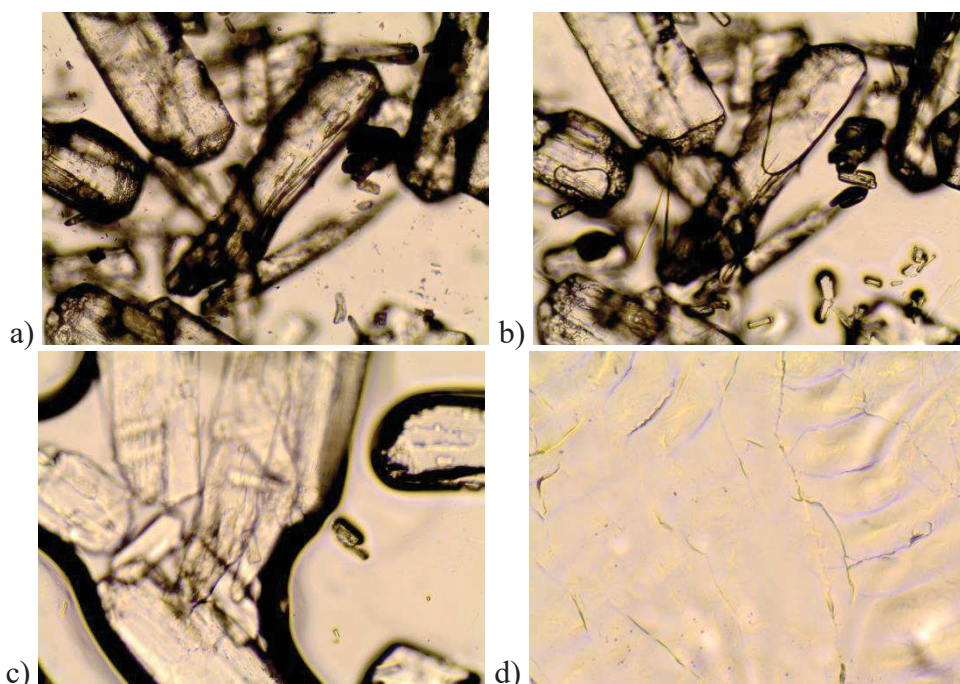
W celu identyfikacji sublimatu, szkiełko podstawowe z PAR umieszczono na stoliku grzewczym termomikroskopu i ogrzano do temp. ok. 155°C, utrzymując tą temperaturę przez ok. 30 min. Na wysokości ok. 3 mm nad próbką umieszczono szklaną szybkę, na której krystalizowały pary ogrzewanej substancji. Następnie uzyskane kryształki badano z wykorzystaniem FTIR, potwierdzając, że jest to PAR w formie jednoskośnej. Przeprowadzono również badanie DSC sublimatu. Temperatura topnienia wyniosła 168°C, co odpowiada topnieniu pierwszej formy krystalicznej PAR [90].



Fot. 3. Zdjęcia termomikroskopowe mieszanin PAR z HPMC, wykonane w temperaturach: 25°C (a), 156°C (b) oraz w temperaturze topnienia PAR (c).

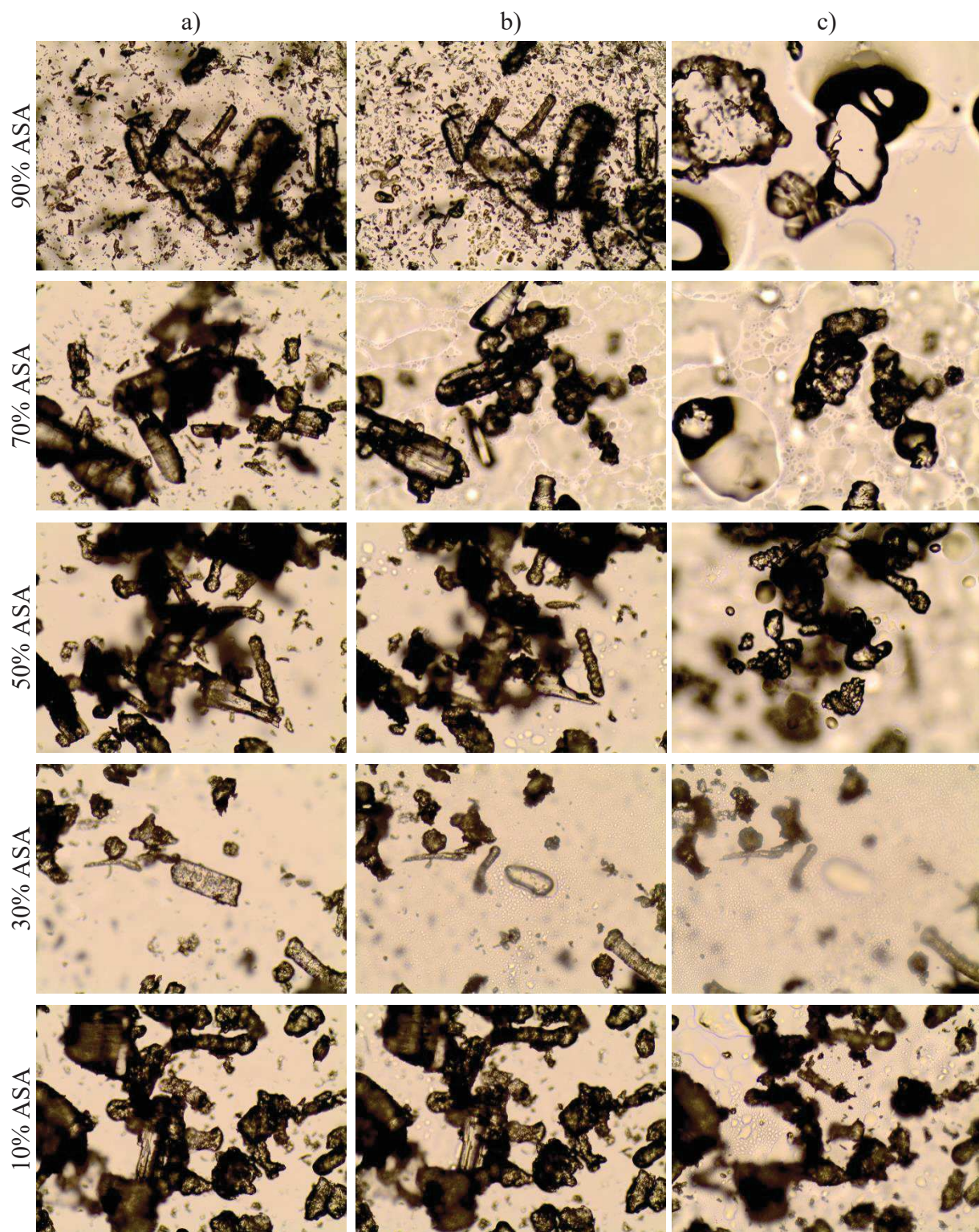
3.3 Kwas acetylosalicylowy

Kryształy ASA obserwowane pod mikroskopem miały zróżnicowaną wielkość. Topnienie kryształów rozpoczęło się w temp. ok. 135°C. Podczas ogrzewania wyczuwalny był zapach kwasu octowego, nasilający się wraz ze wzrostem temperatury. Po ochłodzeniu próbki do temperatury pokojowej, nie obserwowano krystalizacji, natomiast szkiełko nakrywkowe było wilgotne, a ciecz miała zapach kwasu octowego. Poszczególne etapy przemian ASA zilustrowano na Fot. 4.



Fot. 4. Zdjęcia termomikroskopowe ASA wykonane w temperaturach: 25°C (a), 130°C (b), 140°C (c) oraz po ochłodzeniu próbki do temperatury pokojowej (d).

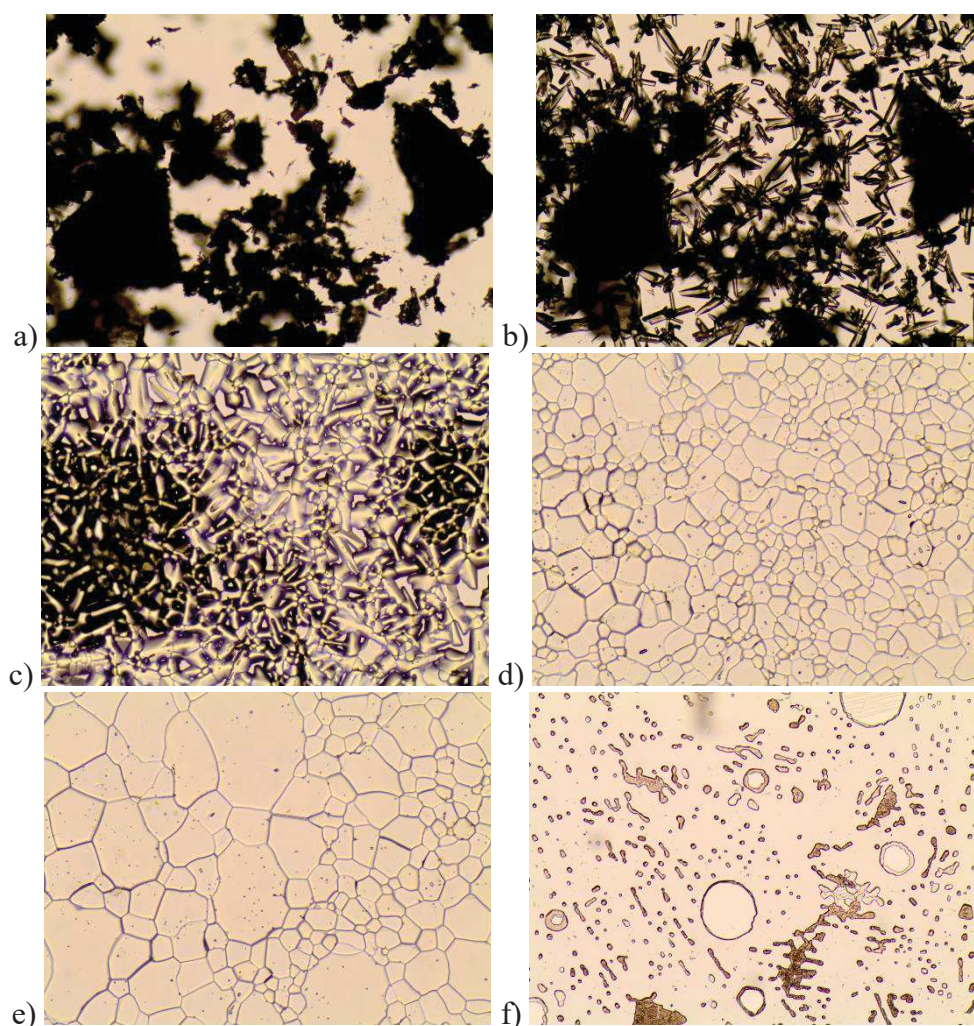
W temperaturze pokojowej, w obrazie termomikroskopowym mieszanin ASA z HPMC, obserwowano strukturę krystaliczną ASA oraz bezpostaciowe ziarna HPMC. Fot. 5 odzwierciedla przemiany, jakim podlegały składniki mieszanin podczas ogrzewania. Topnienie mniejszych kryształków ASA przebiegało w zakresie temp. ok. 105-120°C, natomiast większe topiły się w temp. ok. 132-135°C, z utworzeniem kropelek cieczy i zapachem kwasu octowego, nasilającym się wraz ze wzrostem temperatury. Zapach ten związany jest prawdopodobnie z deacetylacją ASA. Tworzenie się kwasu octowego i kwasu salicylowego podczas ogrzewania potwierdzają także badania nad rozkładem termicznym ASA [168,169]. Temperatura topnienia ASA w mieszaninach jest nieznacznie niższa niż temperatura topnienia substancji czynnej. Jest przy tym zgodna w wynikami uzyskanymi za pomocą DSC.



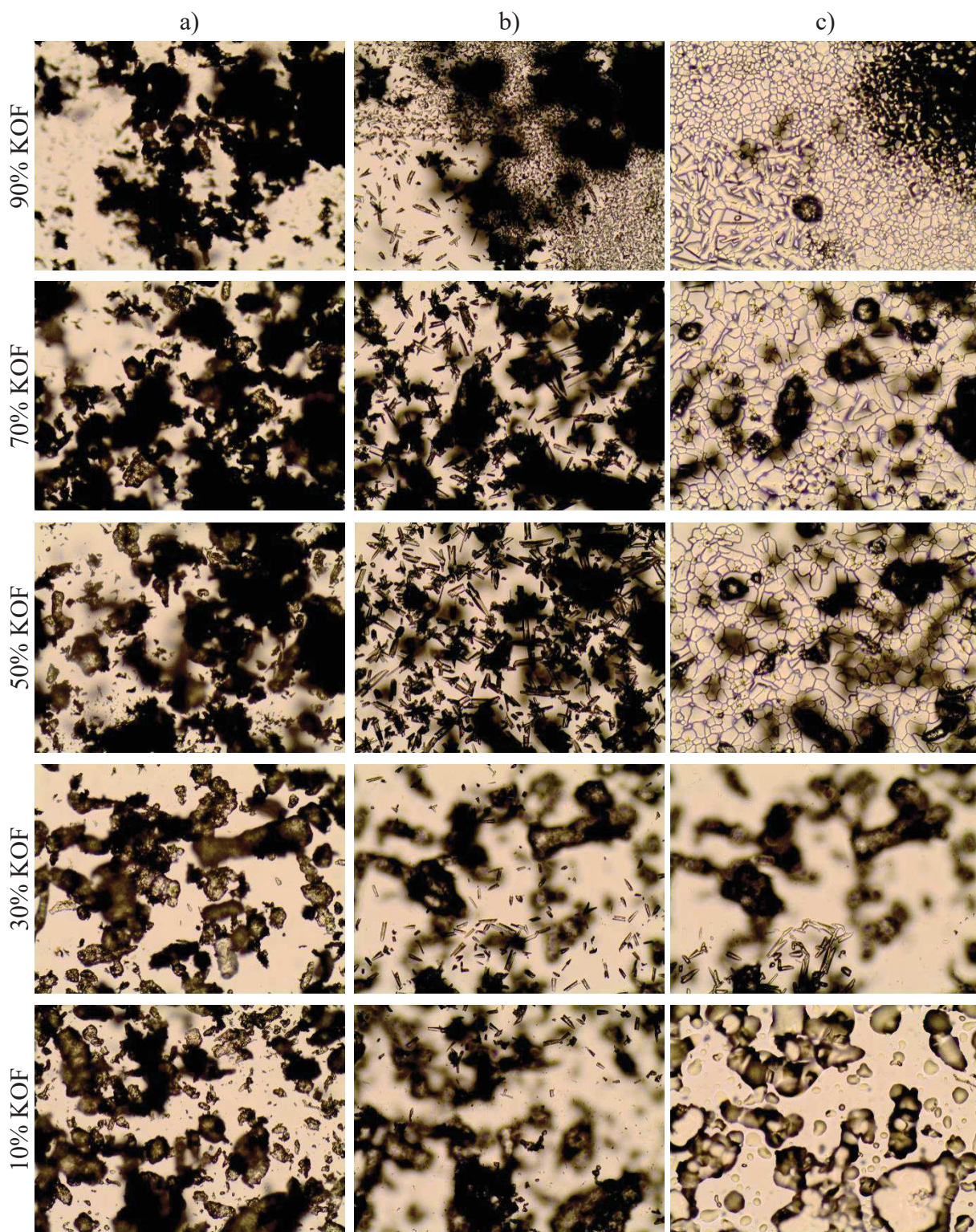
Fot. 5. Zdjęcia termomikroskopowe mieszanin ASA z HPMC, wykonane w temperaturach: 25°C (a), 110°C (b) oraz w temperaturze topnienia ASA (c).

3.4 Kofeina

Przemiany fazowe, jakim podlega kofeina podczas ogrzewania zilustrowano na Fot. 6. W zakresie temp. 25-145°C, widoczne są bardzo drobne kryształki KOF. W temp. powyżej 145°C, substancja intensywnie sublimuje z jednoczesną krystalizacją par substancji na szkiełku nakrywkowym. Tworzące się kryształy są większe, co przedstawiono na Fot. 6b. W temp. ok. 195°C rozpoczyna się topienie KOF (Fot. 6c), w następstwie czego tworzy się dużo drobnych kropelek cieczy, zlewających się powoli w większe krople. Po ochłodzeniu próbki do temperatury pokojowej, krople stopionej KOF krystalizują.



Fot.6. Zdjęcia termomikroskopowe KOF wykonane w temperaturach: 25°C (a), 145°C (b), 195°C (c), 200°C (d), 230°C (e) oraz po ochłodzeniu próbki do temperatury pokojowej (f).



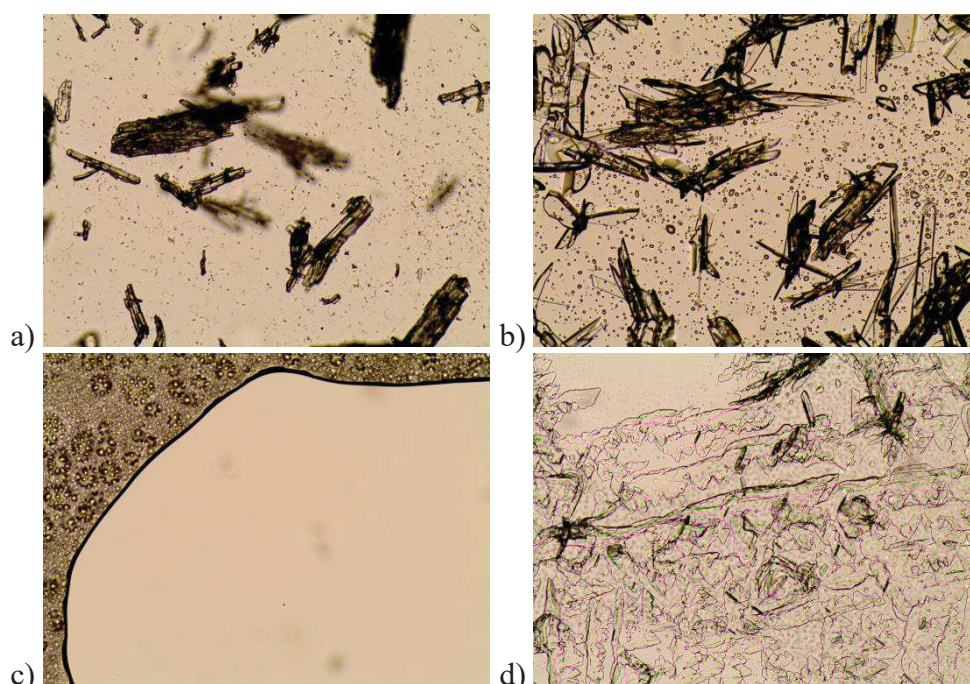
Fot. 7. Zdjęcia termomikroskopowe mieszanin KOF i HPMC, wykonane w temperaturach: 25°C (a) 145°C (b) oraz w temperaturze topnienia KOF (c).

Na Fot. 7 przedstawiono zdjęcia mieszanin KOF z HPMC zawierające 10, 30, 50, 70 i 90% substancji czynnej podczas kolejnych etapów ogrzewania. We wszystkich mieszaninach, w temp. ok. 145°C rozpoczynała się sublimacja KOF. Jednocześnie na szkiełku nakrywkowym

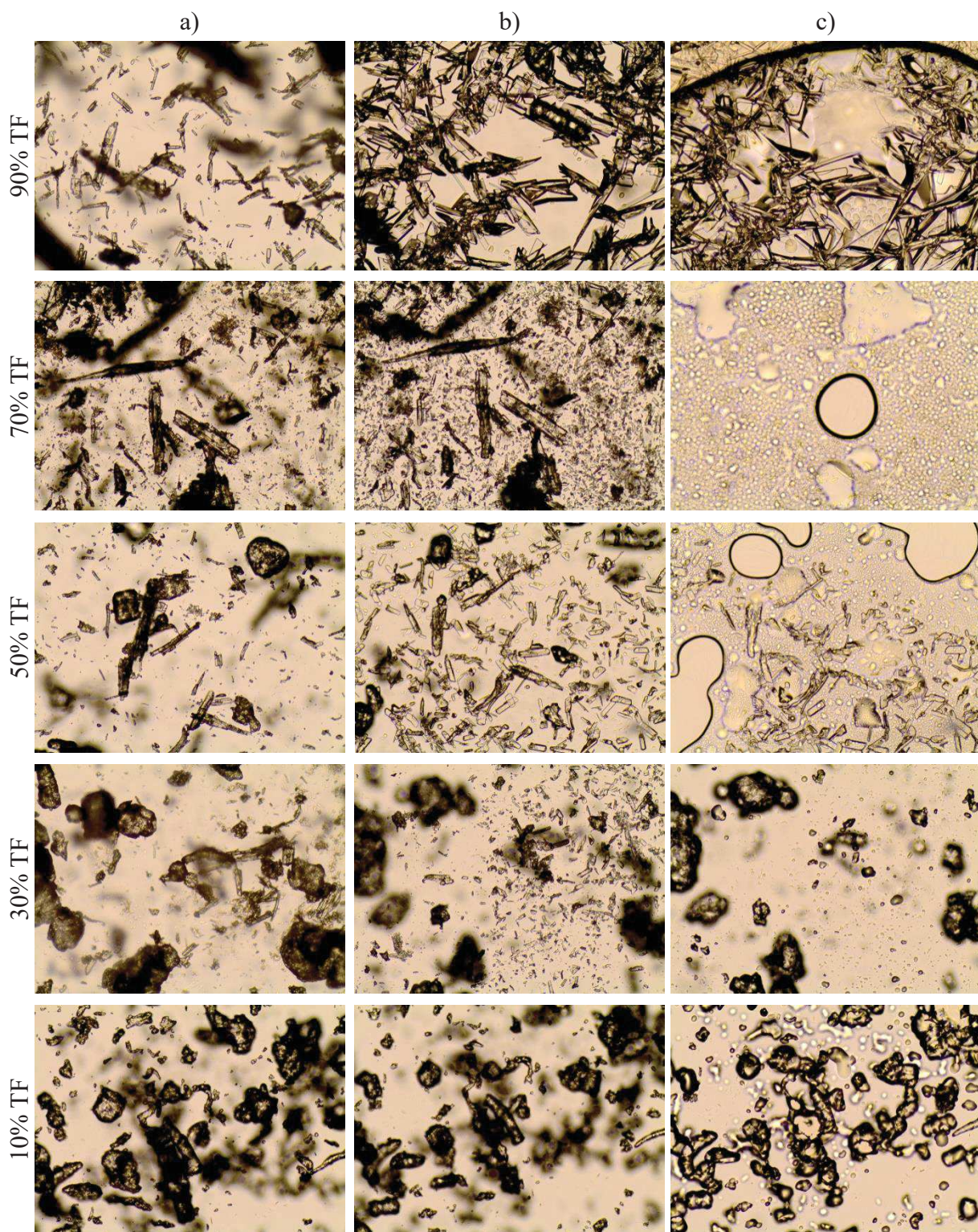
następowała krystalizacja par, z utworzeniem kryształów większych niż wyjściowe. Początek topnienia nowopowstałych kryształów obserwowano w temp. ok. 195°C dla mieszanin zawierających 90, 70 i 50% KOF oraz ok. 188°C dla mieszaniny zawierającej 30% substancji czynnej. Temperatura topnienia KOF z mieszaninie zawierającej 10% KOF była bardzo trudna do określenia, widoczne było jedynie upłynnienie wszystkich składników próbki w temp. ok. 265°C.

3.5 Teofilina

W zakresie temp. 25-270°C, TF występuje w postaci krystalicznej (Fot. 8a). Powyżej temp. 170°C następuje sublimacja, nasilająca się wraz ze wzrostem temperatury. Jednocześnie na szkiełku nakrywkowym krystalizuje sublimująca TF w formie ostro zakończonych kryształów (Fot. 8b). W temp. ok. 270°C TF topi się, a stopiona substancja intensywnie paruje (Fot. 8c). Po ochłodzeniu próbki do temperatury pokojowej, TF ponownie krystalizuje (Fot. 8d).



Fot. 8. Zdjęcia termomikroskopowe TF wykonane w temperaturach: 25°C (a), 245°C (b), 271°C (c) oraz po ochłodzeniu próbki do temperatury pokojowej (d).



Fot.9. Zdjęcia termomikroskopowe mieszanin TF i HPMC, wykonane w temperaturach: 25°C (a), 240°C (b) oraz w temperaturze topnienia TF (c).

Na Fot. 9 przedstawiono zdjęcia mieszanin TF z HPMC, zawierających 10, 30, 50, 70 i 90% substancji czynnej, otrzymane podczas kolejnych etapów ogrzewania. Wszystkie mieszaniny TF z HPMC sublimują powyżej temp. 170°C, przy czym intensywność sublimacji

zmniejszała się wraz z malejącą zawartością TF w mieszaninie. Procesowi sublimacji towarzyszyła rekrytalizacja TF na szkiełku nakrywkowym.

Topnienie małych kryształów TF w mieszaninach rozpoczynało się w temp. 265°C oraz 263°C, odpowiednio dla mieszanin zawierających 90 i 70% TF. Dla mieszaniny zawierającej 50% API, w temp. ok. 260°C topiły się kryształki TF znajdujące się z bezpośrednim sąsiedztwie ziaren HPMC, natomiast w temp. ok. 260°C obserwowano zeszklenie ziaren HPMC, topnienie większych kryształów z równoczesnym zlewaniem się ciekłych faz. W obrazie termomikroskopowym mieszaniny zawierającej 30% API, topnienie kryształków TF obserwowano w temp. ok. 245°C, natomiast w temp. ok. 255°C, zeszklenie HPMC. W mieszaninie zawierającej 10% API nie zaobserwowano topnienia kryształów, a jedynie upłynnienie próbki w temp. ok. 260°C.

3.6 Podsumowanie

Temperatury topnienia uzyskane z wykorzystaniem termomikroskopu są zbliżone do wartościami uzyskanych za pomocą DSC. Dodatkowo, w przypadku PAR, KOF i TF, stwierdzono intensywną sublimację z jednoczesną krystalizacją par na szkiełku nakrywkowym. ASA w formie substancji i mieszanin z HPMC ulega deacetylacji, nasilającej się w podwyższonej temperaturze.

Przy pomocy termomikroskopu nie stwierdzono natomiast tworzenia się w podwyższonej temperaturze nowych kryształów lub cząstek amorficznych substancji czynnych, których wygląd byłby inny niż substancji wyjściowych.

4. Diagramy fazowe

Podjmując próbę oceny możliwości wykorzystania metody DSC w analizie ilościowej handlowych preparatów farmaceutycznych stwierdzono, że krzywe zależności entalpii topnienia od zawartości substancji czynnej w mieszaninie są przesunięte względem początku układu współrzędnych. Szczególnie duże przesunięcia obserwowano w przypadku mieszanin substancji czynnych z HPMC. Z doniesień literaturowych wiadomo, że wybrane do badań substancje lecznicze oraz HPMC zdolne są do tworzenia wiązań wodorowych [157,160-165]. Na podstawie analizy widm spektroskopowych nie stwierdzono jednak występowania takich wiązań pomiędzy PAR, TF, KOF i ASA a HPMC. Stosując badania termomikroskopowe nie

stwierdzono również tworzenia się form krystalicznych lub amorficznych, które byłyby inne niż te związane z obecnością badanych substancji leczniczych lub bezpostaciowego polimeru.

Znane są doniesienia literaturowe wskazujące na utratę krystaliczności substancji leczniczych w wyniku ich homogenizacji z HPMC [170,171]. Opisano również zjawisko częściowego rozpuszczania substancji czynnej w polimerze oraz wzajemnej mieszalności obu składników, rozumianej jako zdolność do tworzenia trwałej dyspersji, w której mieszanina wykazuje właściwości fizyczne różne od właściwości poszczególnych składników [77,109,110,172]. Ilościowej interpretacji tych zjawisk można dokonać opracowując diagramy fazowe dla mieszanin krystalicznych substancji czynnych z bezpostaciowymi polimerami.

Diagramy fazowe obrazują współwystępowanie różnych form składników mieszanin, w zależności od składu mieszaniny i jej temperatury. Klasyczny diagram fazowy konstruuje się w oparciu o temperatury topnienia dwóch składników występujących w formie krystalicznej. HPMC będąca polimerem nie topi się, natomiast charakteryzuje ją przemiana szklista. Opracowanie diagramu fazowego dla mieszanin złożonych z krystalicznej substancji leczniczej i polimeru polega na wyznaczeniu trzech krzywych prognozujących rozpuszczalność substancji krystalicznej w polimerze, wzajemną mieszalność składników oraz przewidywaną temperaturę przemiany szklistej mieszanin. Diagramy fazowe dla mieszanin PAR, TF, KOF i ASA z HPMC obrazują stany równowagi w funkcji składu mieszanin, prognozowane na podstawie obliczeń.

4.1 Krzywa rozpuszczalności

Krzywa rozpuszczalności substancji czynnej w polimerze odzwierciedla ilość substancji czynnej, która może ulec rozpuszczeniu w polimerze. Ilość tą oblicza się jako ułamek molowy substancji rozpuszczonej w polimerze (x_{API}) w funkcji współczynnika aktywności (γ_{API}) [77,172]:

$$\ln x_{API} = \frac{\Delta H_{fus}}{RT_m} \left(1 - \frac{T_m}{T}\right) - \ln \gamma_{API}$$

gdzie: ΔH_{fus} oznacza entalpię topnienia substancji czynnej, R stałą gazową, T_m oraz T oznaczają odpowiednio temperaturę topnienia substancji czynnej i temperaturę występującą w mieszaninie. Na potrzeby obliczeń temperaturę wyrażono w Kelwinach, natomiast wykreślając diagramy fazowe użyto powszechnie stosowanej skali Celsjusza.

Do obliczenia współczynnika aktywności substancji czynnej (γ_{API}) wykorzystano parametry rozpuszczalności Hansena (δ), które są miarą oddziaływań międzycząsteczkowych.

Różnicuje się je na oddziaływania związane z dyspersją cząstek (δ_d), oddziaływania polarne (δ_p) oraz oddziaływania wynikające z utworzenia wiązań wodorowych (δ_h):

$$\ln \gamma_{API} = \frac{V_{API}}{RT} \left\{ (\delta_d^{API} - \bar{\delta}_d)^2 + 0,25 \left[(\delta_p^{API} - \bar{\delta}_p)^2 + (\delta_h^{API} - \bar{\delta}_h)^2 \right] \right\} + \ln \frac{V_{API}}{\bar{V}} + 1 - \frac{V_{API}}{\bar{V}}$$

gdzie: V oznacza objętość molową poszczególnych składników mieszaniny (k), $\bar{\delta}$ odpowiada objętości molowej ważonego parametru rozpuszczalności Hansena, natomiast \bar{V} to objętość mieszaniny.

Objętość mieszaniny (\bar{V}) oraz objętość molową ważonego parametru rozpuszczalności Hansena ($\bar{\delta}$) obliczono dla różnych typów oddziaływań (d - dyspersyjnych, p - polarnych i h - wiązań wodorowych) wg następujących wzorów:

$$\bar{\delta} = \sum_{k=1}^n \phi_k \delta_k \quad (\text{dla } \bar{\delta}_d, \bar{\delta}_p, \bar{\delta}_h, \text{ gdzie } k = \text{API lub polimer})$$

$$\phi_k = \frac{x_k V_k}{\bar{V}}$$

$$\bar{V} = \sum_{k=1}^n x_k V_k$$

$$V_k = \frac{M_k}{\rho_k}$$

W powyższych równaniach ϕ jest ułamkiem objętościowym poszczególnych składników mieszaniny, x stanowi ich ułamek molowy, M oznacza masę molową, zaś ρ to gęstość składnika (API lub polimeru).

4.2 Krzywa mieszalności

Krzywa mieszalności obrazuje wartość temperatury oszacowaną na podstawie obliczeń, w której składniki mieszaniny homogenizowane w założonych proporcjach będą tworzyły trwałą dyspersję o dobrej mieszalności. Jest to stan, w którym cząstki poszczególnych składników nie będą wykazywały tendencji do agregacji.

Opracowanie krzywej mieszalności składników opiera się na wykorzystaniu teorii Florry-Huggins'a i energii swobodnej Gibbsa dla mieszaniny dwuskładnikowej (ΔG_{mix}) [77,173,174,175]. Energię swobodną Gibbsa wyznacza się na podstawie równania:

$$\Delta G_{mix} = RT \left[\phi_{API} \ln \phi_{API} + \frac{1 - \phi_{API}}{n} \ln(1 - \phi_{API}) + \chi \phi_{API} (1 - \phi_{API}) \right]$$

W równaniu tym parametr n oznacza liczbę moli substancji czynnej mającej styczność z polimerem. Natomiast χ jest miarą oddziaływań pomiędzy substancją czynną i polimerem.

Oba parametry oblicza się wg poniższych wzorów, w których v stanowi objętość cząsteczki substancji czynnej, natomiast δ oznacza całkowitą wartość parametru rozpuszczalności:

$$n = \frac{V_{polimer}}{V_{API}}$$

$$\chi = \frac{v(\delta_{API} - \delta_{polimer})^2}{RT}$$

$$\delta_k = \sqrt{\delta_d^2 + \delta_p^2 + \delta_h^2}$$

Krzywa mieszalności substancji czynnej z polimerem jest wykresem temperatury, w której różnica energii swobodnej w mieszaninie jest równa zero, przez co układ jest energetycznie trwały, a składniki nie wykazują tendencji do agregacji. Wartość temperatury, w której mieszalność składników będzie całkowita, wyznacza się przez przyrównanie drugiej pochodnej energii swobodnej Gibbsa do zera, co prowadzi do równania:

$$T_s = \frac{2v(\delta_{API} - \delta_{polimer})^2}{R} * \frac{1}{\frac{1}{\phi_{API}} - \frac{1}{m(1 - \phi_{API})}}$$

Wynikiem obliczeń jest temperatura, w której założona ilość substancji czynnej jest zdolna do swobodnego mieszania się z HPMC.

4.3 Krzywa przemiany szklistej

Krzywa przemiany szklistej odzwierciedla wartość temperatury uzyskaną na podstawie obliczeń, w której spodziewane jest zeszklenie zhomogenizowanych składników mieszaniny. Krzywa obrazująca prognozowaną temperaturę przemiany szklistej opiera się na zależności temperatury zeszklenia od ułamka masowego substancji czynnej (w_{API}), zgodnie z równaniem Fox'a. Temperaturę zeszklenia mieszaniny (T_g) oblicza się na podstawie temperatury przemiany szklistej poszczególnych składników mieszaniny ($T_{g_{API}}$ i $T_{g_{polimer}}$) [77]:

$$\frac{1}{T_g} = \frac{w_{API}}{T_{g_{API}}} + \frac{1 - w_{API}}{T_{g_{polimer}}}$$

4.4 Wyznaczanie diagramu fazowego

W Tabeli 25 zestawiono parametry wykorzystane do opracowania diagramów fazowych. Dla KOF, TF oraz ASA nie znaleziono danych literaturowych opisujących formy amorficzne tych substancji leczniczych. Z tego powodu diagramy fazowe dla tych substancji

czynnych w mieszaninie z HPMC składają się jedynie z krzywych rozpuszczalności i mieszalności, a nie zawierają krzywej prognozowanej temperatury przemiany szklistej.

Tabela 25. Wartości parametrów wykorzystanych do opracowania diagramów fazowych.

Parametr	HPMC	PAR	KOF	TF	ASA	
Masa molowa [g/mol]	10000 ^a	151,16 ^a	194,19 ^d	180,16 ^g	180,16 ^d	
Gęstość [g/cm ³]	1,00 ^a	1,26 ^b	1,23 ^e	1,35 ^g	1,40 ^e	
Entalpia topnienia [J/mol]	-	27567	19736	28264	30203	
Objętość molowa [cm ³ /mol]	10000	139,0 ^a	157,9 ^d	133,45	128,7 ^d	
Objętość cząsteczki (300K) [Å ³]	-	772,26 ^b	827,1 ^e	898,43 ^f	860,56 ^b	
Temperatura zeszklenia [K]	433,15	296 ^c	-	-	-	
Temperatura topnienia [K]	-	442,55	509,34	544,97	416,17	
Parametry rozpuszczalności	δ_d	17,0 ^a	20,7 ^a	19,5 ^d	17,0 ^g	19,0 ^d
	δ_p	8,6 ^a	12,7 ^a	10,1 ^d	11,0 ^g	6,6 ^d
	δ_h	9,0 ^a	17,5 ^a	13,0 ^d	12,0 ^g	9,3 ^d
	δ	21,03	29,96	25,52	23,53	25,02

Oznaczenia a-g dotyczą pozycji piśmiennictwa, z których zaczerpnięto wartości liczbowe parametrów niezbędnych do wyznaczenia diagramów fazowych: a [176], b [177], c [178], d [179], e [180], f [181], g [182].

4.5 Charakterystyka diagramów fazowych

Diagramy fazowe (Rys. 27, 30-32) umożliwiają przewidywanie stabilności poszczególnych faz w dwuskładnikowej mieszaninie, w zależności od temperatury [77]. Obszar powyżej krzywej rozpuszczalności, to część diagramu, który odpowiada układowi faz termodynamicznie stabilnych. Strefa pomiędzy krzywymi mieszalności i rozpuszczalności stanowi układ niestabilny termodynamicznie. Natomiast obszar znajdujący się po lewej stronie od krzywej mieszalności odzwierciedla zdolność składników mieszaniny do rozdzielania się.

Paracetamol z hypromelozą

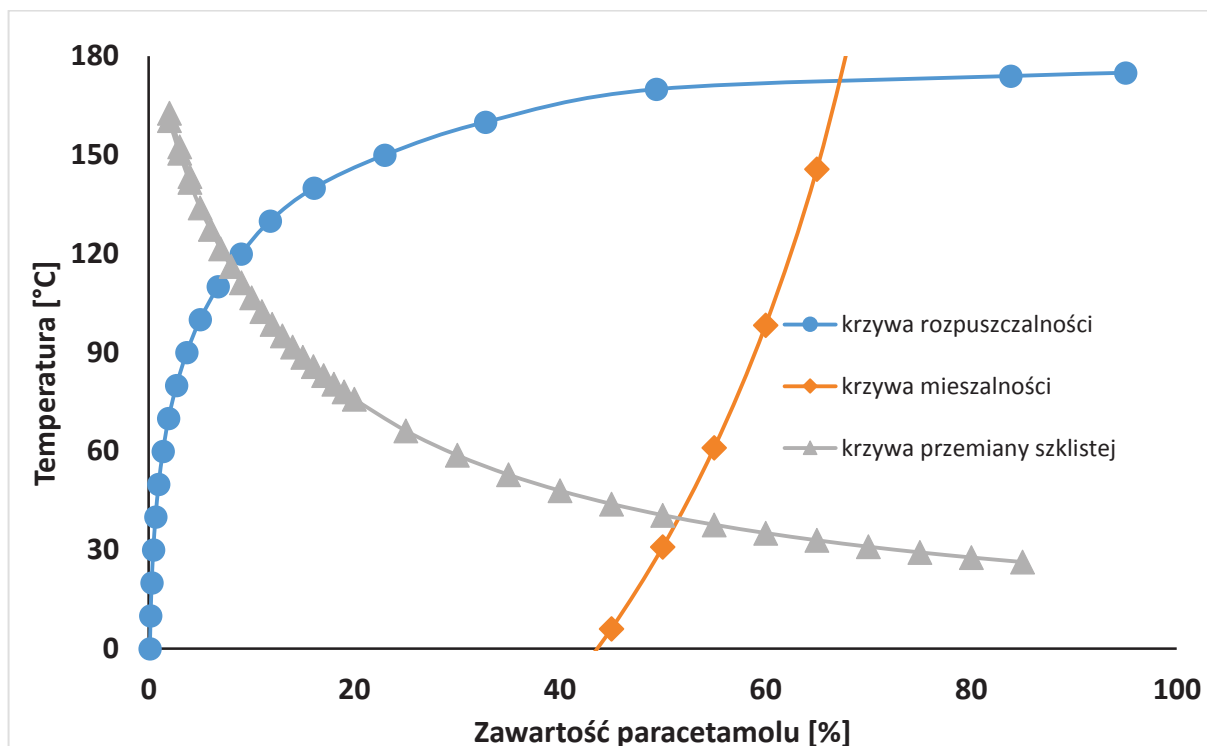
Diagram fazowy obrazujący stan równowagi w mieszaninie PAR z HPMC (Rys. 27) został sporządzony na podstawie wyników obliczeń zestawionych w Tabelach 26 i 27. Krzywa rozpuszczalności stanowi graniczną ilość PAR, jaka może ulec rozpuszczeniu w HPMC, obliczoną dla zakresu temp. od 0 do 160°C. Ilość ta, podobnie do rozpuszczalności rozpatrywanej w fazie ciekłej, zależy od temperatury, w jakiej znajduje się mieszanina oraz od

proporcji składników. W temp. 20°C ilość PAR, która może ulec rozpuszczeniu w HPMC nie przekracza 1,84%, jest więc niewielka. W temp. 100°C ilość ta wynosi nie więcej niż 25%, natomiast w temperaturze topnienia PAR przekracza 95% PAR. Rzeczywista ocena ilości substancji czynnej, która w badanych mieszaninach mogła ulec rozpuszczeniu w polimerze jest złożona, ze względu na trudność w ocenie temperatury, jaką osiągnęły składniki mieszaniny w trakcie jej homogenizacji. Podobnie, ocena ilości substancji rozpuszczonej w matrycy tabletki opracowywanej dla celów technologii postaci leku jest utrudniona, ze względu na złożoność składu matrycy oraz podwyższoną temperaturę na różnych etapach procesu produkcyjnego, zwykle podczas suszenia granulatu i w procesie tabletkowania.

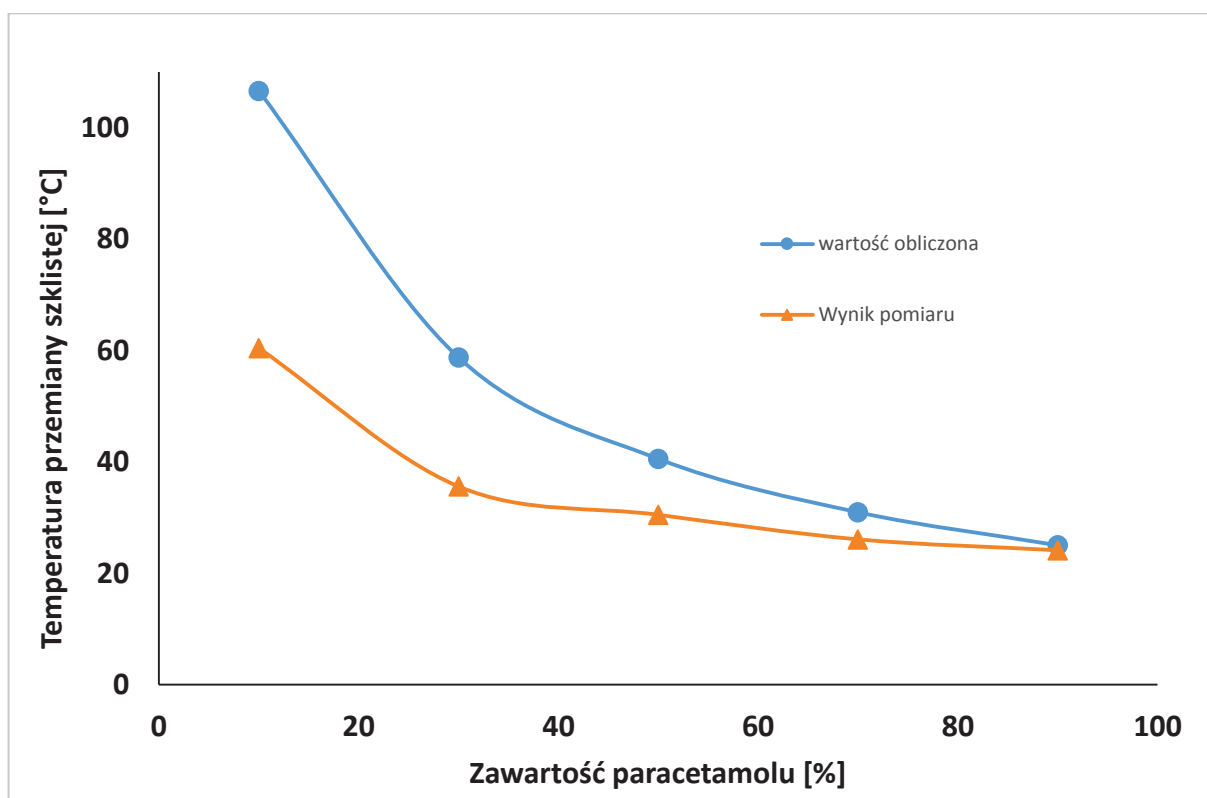
W przypadku krzywej mieszalności wartość obliczoną stanowi temperatura, w której uzyskać można pełną mieszalność składników, przy założonej ich proporcji. Do wykreślenia krzywej mieszalności wykorzystano zakres temperatur mieszczący się w przedziale od 0°C do temperatury topnienia PAR. Wartości te zaznaczono w Tabeli 27 pogrubioną czcionką.

W obszarze, który odpowiada układowi faz niemieszających się ze sobą spodziewać się należy, że zjawisko mieszania nie będzie wpływało na entalpię topnienia substancji czynnej. Krzywa mieszalności PAR z HPMC przecina oś odciętych przy zawartości ok. 43% PAR. Krzywa zależności entalpii topnienia PAR od jego zawartości w mieszaninie z HPMC homogenizowanej pistlem jest przesunięta względem początku układu współrzędnych o 37,45 J/g (Tabela 11). W odniesieniu do entalpii topnienia PAR (184,70 J/g) jest to przesunięcie odpowiadające 20,28% zawartości substancji czynnej.

Krzywa mieszalności została opracowana na podstawie obliczeń, z wykorzystaniem danych zaczerpniętych z piśmiennictwa. Dodatkowo, wartości obliczone zakładają niczym nie zaburzoną styczność pomiędzy komórkami elementarnymi kryształów a ziarnami polimeru. Warunki takie zostałyby uzyskane jedynie w sytuacji, gdyby mieszanina osiągnęła temperaturę topnienia substancji krystalicznej lub gdyby stałą dyspersję uzyskano przez wspólne wytrącanie obu substancji z roztworu [183]. W trakcie homogenizacji mieszanin za pomocą pistla dochodzi do roztarcia kryształów, jednak nie w takim stopniu, aby ich wielkość odpowiadała cząstce elementarnej kryształu. Mieszanie składników za pomocą kliszy nie prowadzi do zmniejszenia kryształów, ich wielkość pozostaje więc niezmienną w porównaniu z cząstkami użytymi do sporządzenia mieszanin. Konsekwencją tego jest gorsza styczność pomiędzy składnikami mieszanin.



Rys. 27. Diagram fazowy dla dwuskładnikowej mieszaniny PAR z HPMC.



Rys. 28. Krzywe przemiany szklistej mieszaniny PAR z HPMC wyznaczone na podstawie wartości obliczonych oraz zmierzonych.

Również wartość bezwzględna przesunięcia tej krzywej względem początku układu współrzędnych jest zdecydowanie mniejsza, w porównaniu z mieszaniną homogenizowaną pistlem i wynosi 12,39 J/g; (Tabela 11), co odpowiada 6,71% PAR.

Krzywa przemiany szklistej obrazuje prognozowaną temperaturę, w której nastąpi zeszklenie mieszaniny o określonym składzie. Przeprowadzono dodatkowo badania DSC mieszanin PAR z HPMC, zawierających 90, 70, 50, 30 i 10% PAR, w trakcie którego próbki ogrzewano do temp. 250°C, szybko chłodzono do temp. -25°C i ponownie ogrzewano. Analizę DSC wykorzystano w celu porównania obliczonych wartości temperatury przemiany szklistej, z wartościami wyznaczonymi doświadczalnie. Uzyskane dane zestawiono w Tabeli 27. Na Rys. 28 przedstawiono porównanie obliczonej temperatury przemiany szklistej mieszaniny z wartościami uzyskanymi w trakcie ogrzewania próbki po jej uprzednim ochłodzeniu. Do porównania wykorzystano wartości obliczone dla zawartości PAR w mieszaninie, dla których przeprowadzono badania DSC polegające na kolejnym ogrzewaniu schłodzonej uprzednio próbki. Zbieżność tych wartości jest tym większa, im wyższa zawartość PAR w mieszaninie.

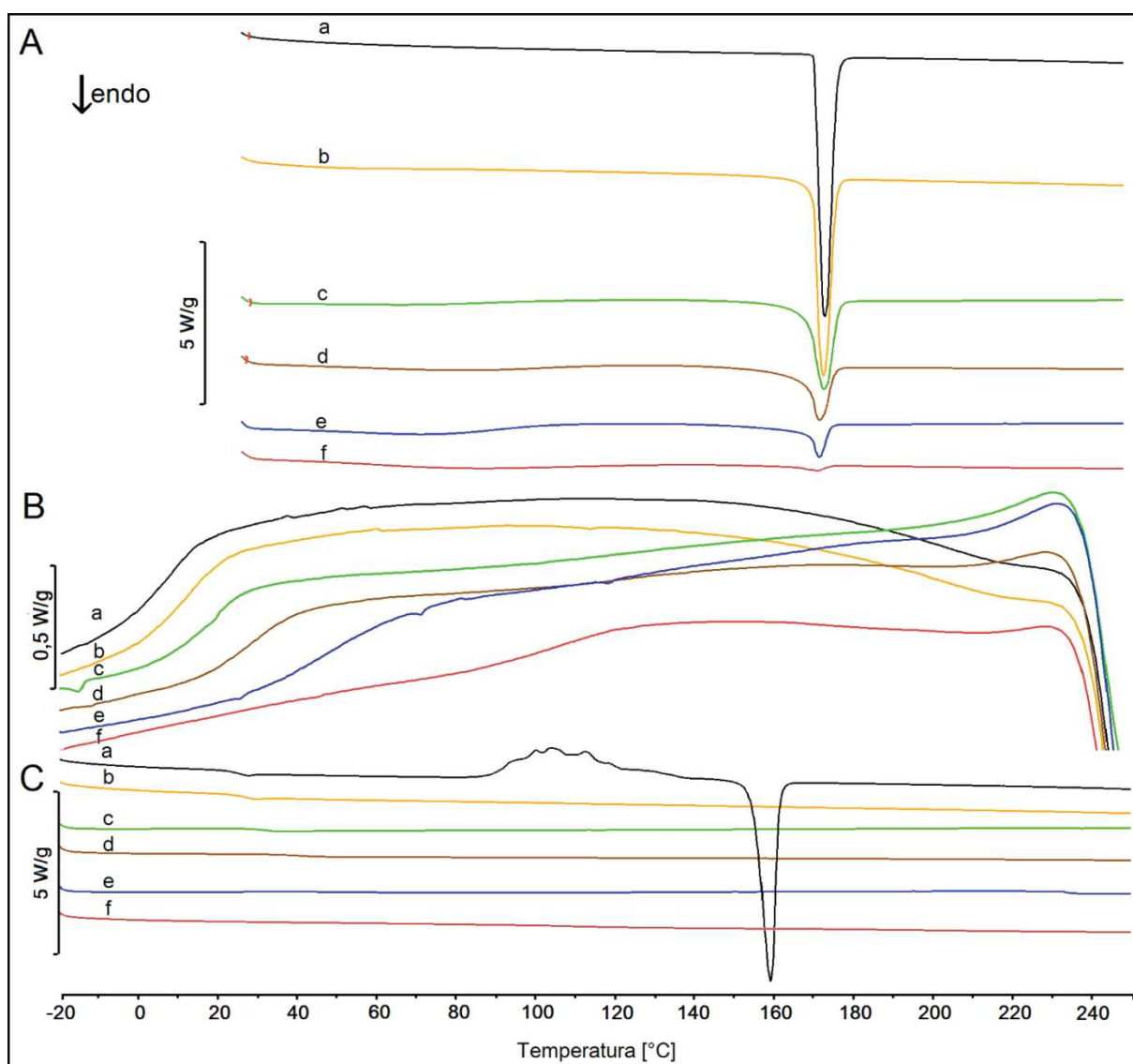
Tabela 26. Dane charakteryzujące rozpuszczalność PAR w HPMC, w zależności od temperatury mieszanki.

Zawartość PAR w mieszaninie [%]	Ilość PAR, która może ulec rozpuszczeniu w HPMC																
	Temperatura [°C]																
	0	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110	120	130	140	150	160
95	0,75	1,20	1,84	2,75	4,01	5,71	7,97	10,89	14,63	19,34	25,18	32,34	41,01	51,39	63,71	78,17	95,0
90	0,71	1,13	1,74	2,60	3,79	5,40	7,53	10,30	13,84	18,29	23,83	30,61	38,82	48,65	60,32	74,03	
85	0,67	1,06	1,63	2,44	3,56	5,08	7,09	9,70	13,04	17,24	22,46	28,86	36,62	45,91	56,94	69,90	
80	0,62	0,99	1,53	2,29	3,34	4,76	6,64	9,10	12,24	16,19	21,10	27,13	34,44	43,20	53,59	65,82	
75	0,58	0,92	1,42	2,13	3,11	4,44	6,21	8,51	11,45	15,16	19,77	25,43	32,30	40,54	50,32	61,82	
70	0,54	0,85	1,32	1,98	2,90	4,14	5,78	7,93	10,68	14,15	18,48	23,78	30,22	37,95	47,13	57,94	
65	0,49	0,79	1,22	1,83	2,68	3,84	5,37	7,37	9,94	13,18	17,22	22,18	28,21	35,45	44,06	54,19	
60	0,45	0,73	1,12	1,69	2,48	3,55	4,98	6,84	9,23	12,25	16,02	20,65	26,28	33,05	41,10	50,60	
55	0,42	0,67	1,03	1,56	2,29	3,28	4,60	6,33	8,55	11,36	14,87	19,18	24,44	30,76	38,28	47,16	
50	0,38	0,61	0,95	1,43	2,10	3,02	4,24	5,84	7,90	10,51	13,77	17,79	22,69	28,58	35,60	43,90	
45	0,35	0,56	0,87	1,31	1,93	2,78	3,90	5,39	7,29	9,71	12,74	16,48	21,03	26,52	33,07	40,80	
40	0,31	0,51	0,79	1,20	1,77	2,55	3,59	4,96	6,72	8,96	11,77	15,24	19,47	24,58	30,67	37,89	
35	0,29	0,46	0,72	1,09	1,62	2,33	3,29	4,55	6,18	8,26	10,86	14,07	18,00	22,75	28,42		
30	0,26	0,42	0,66	1,00	1,48	2,13	3,02	4,18	5,68	7,60	10,00	12,98	16,63	21,04	26,31		
25	0,23	0,38	0,60	0,91	1,35	1,95	2,76	3,83	5,22	6,99	9,21	11,97	15,35	19,44	24,34		
20	0,21	0,34	0,54	0,82	1,23	1,78	2,52	3,51	4,78	6,42	8,47	11,02	14,15	17,94			
19	0,21	0,34	0,53	0,81	1,20	1,75	2,48	3,44	4,70	6,31	8,33	10,84	13,92	17,66			
18	0,20	0,33	0,52	0,79	1,18	1,71	2,43	3,38	4,62	6,20	8,19	10,66	13,70	17,38			
17	0,20	0,32	0,51	0,78	1,16	1,68	2,39	3,32	4,54	6,09	8,05	10,49	13,47				
16	0,19	0,32	0,50	0,76	1,14	1,65	2,35	3,27	4,46	5,99	7,92	10,31	13,26				
15	0,19	0,31	0,49	0,75	1,12	1,62	2,30	3,21	4,38	5,89	7,78	10,14	13,04				
14	0,19	0,30	0,48	0,73	1,09	1,59	2,26	3,15	4,31	5,79	7,65	9,98	12,83				
13	0,18	0,30	0,47	0,72	1,07	1,56	2,22	3,09	4,23	5,69	7,52	9,81	12,62				
12	0,18	0,29	0,46	0,71	1,05	1,53	2,18	3,04	4,16	5,59	7,40	9,65					
11	0,17	0,29	0,45	0,69	1,03	1,50	2,14	2,99	4,08	5,49	7,27	9,49					
10	0,17	0,28	0,44	0,68	1,01	1,48	2,10	2,93	4,01	5,40	7,15	9,33					
9	0,17	0,27	0,43	0,67	0,99	1,45	2,06	2,88	3,94	5,31	7,03						
8	0,16	0,27	0,42	0,65	0,98	1,42	2,03	2,83	3,87	5,21	6,91						
7	0,16	0,26	0,42	0,64	0,96	1,39	1,99	2,78	3,81	5,12							
6	0,16	0,26	0,41	0,63	0,94	1,37	1,95	2,73	3,74	5,04							
5	0,15	0,25	0,40	0,62	0,92	1,34	1,92	2,68	3,67	4,95							
4	0,15	0,25	0,39	0,60	0,90	1,32	1,88	2,63	3,61								
3	0,15	0,24	0,38	0,59	0,89	1,29	1,85	2,58									
2	0,14	0,24	0,38	0,58	0,87	1,27	1,81										

Tabela 27. Wartości temperatur mieszalności oraz przemiany szklistej dla mieszanin PAR z HPMC.

Zawartość PAR w mieszaninie [%]	Ułamek molowy (x)		Ułamek objętościowy (ϕ)		Temperatura pełnej mieszalności składników [°C]	Temperatura przemiany szklistej [°C]	
	PAR	HPMC	PAR	HPMC		Obliczona	DSC
95	0,9992	0,0008	0,938	0,062	2097,6	23,9	
90	0,9983	0,0017	0,877	0,123	1029,3	25,0	24,13
85	0,9973	0,0027	0,818	0,182	631,2	26,3	
80	0,9962	0,0038	0,760	0,240	423,1	27,7	
75	0,9950	0,0050	0,704	0,296	295,1	29,2	
70	0,9936	0,0064	0,649	0,351	208,4	31,0	26,09
65	0,9919	0,0081	0,596	0,404	145,8	32,9	
60	0,9900	0,0100	0,543	0,457	98,3	35,1	
55	0,9878	0,0122	0,492	0,508	61,0	37,6	
50	0,9851	0,0149	0,442	0,558	30,9	40,6	30,50
45	0,9819	0,0181	0,394	0,606	6,0	44,0	
40	0,9778	0,0222	0,346	0,654	-15,0	48,0	
35	0,9727	0,0273	0,299	0,701	-33,1	52,8	
30	0,9659	0,0341	0,254	0,746	-49,1	58,8	35,59
25	0,9566	0,0434	0,209	0,791	-63,6	66,2	
20	0,9430	0,0570	0,166	0,834	-77,1	75,8	
19	0,9395	0,0605	0,157	0,843	-79,8	78,0	
18	0,9356	0,0644	0,148	0,852	-82,5	80,4	
17	0,9313	0,0687	0,140	0,860	-85,2	83,0	
16	0,9265	0,0735	0,131	0,869	-88,0	85,7	
15	0,9211	0,0789	0,123	0,877	-90,8	88,6	
14	0,9150	0,0850	0,114	0,886	-93,7	91,7	
13	0,9081	0,0919	0,106	0,894	-96,6	95,0	
12	0,9002	0,0998	0,098	0,902	-99,8	98,6	
11	0,8910	0,1090	0,089	0,911	-103,0	102,5	
10	0,8802	0,1198	0,081	0,919	-106,5	106,7	60,44
9	0,8674	0,1326	0,073	0,927	-110,4	111,2	
8	0,8519	0,1481	0,065	0,935	-114,6	116,1	
7	0,8328	0,1672	0,056	0,944	-119,4	121,5	
6	0,8085	0,1915	0,048	0,952	-125,1	127,4	
5	0,7769	0,2231	0,040	0,960	-132,0	133,9	
4	0,7338	0,2662	0,032	0,968	-140,8	143,5	
3	0,6717	0,3283	0,024	0,976	-152,8	152,5	
2	0,5745	0,4255	0,016	0,984	-170,8	162,8	

Na podstawie badań DSC stwierdzono, że stopiony PAR podczas szybkiego chłodzenia uległ amorfizacji (Rys. 29) [184]. W temp. ok. 23°C następuje jego przemiana szklista widoczna na krzywej DSC w formie przegięcia. Następnie obserwowano egzotermiczny, poszerzony pik, związany z rekrytalizacją PAR do formy II oraz stopienie tej formy w temp. ok. 160°C. Na Rys. 29 przedstawiono krzywe podwójnego chłodzenia uzyskane dla PAR oraz jego mieszanin z HPMC, zawierających 90, 70, 50, 30 i 10% substancji czynnej. Na żadnej z krzywych drugiego ogrzewania mieszanin nie stwierdzono obecności egzotermicznego pików związanego z krystalizacją PAR, ani endotermicznego pików topnienia. Stopienie PAR z HPMC doprowadziło więc do utworzenia amorficznej formy PAR, której krystalizacja została zahamowana w obecności polimeru.

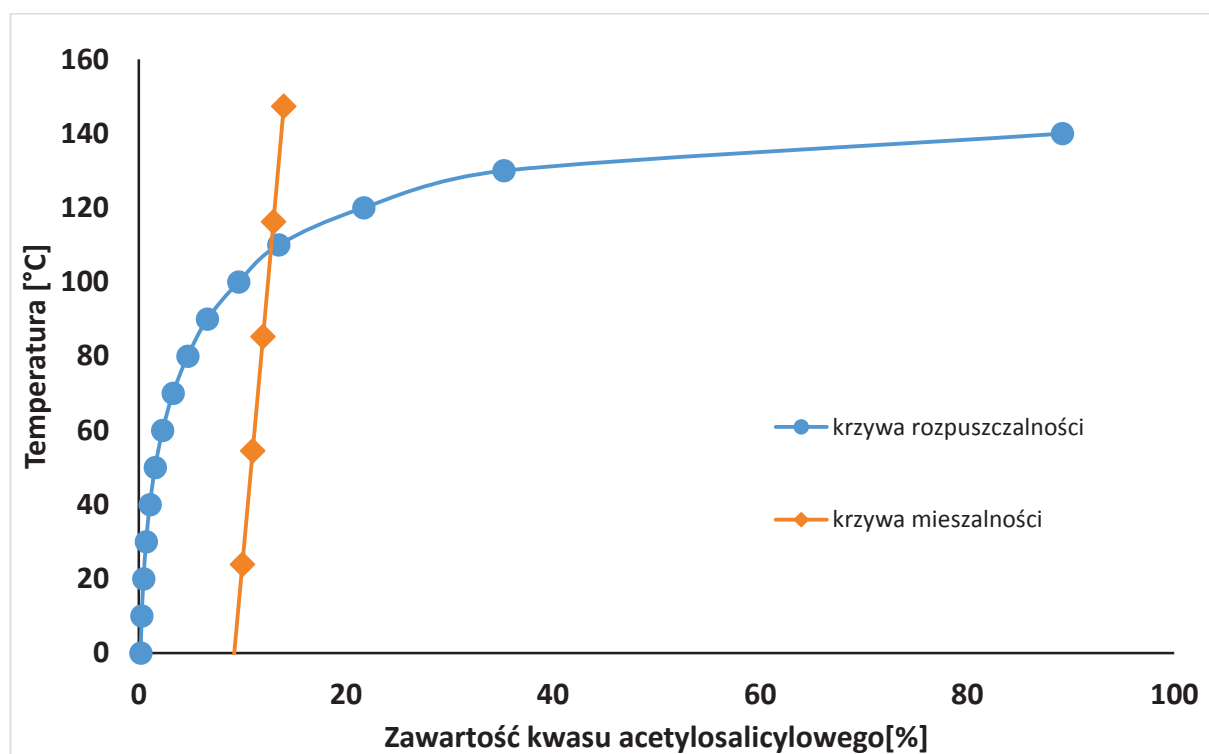


Rys. 29. Krzywe DSC PAR (a) i jego mieszanin z HPMC, zawierających 90 (b), 70 (c), 50 (d), 30 (e) i 10% (f) substancji czynnej. A i C oznaczają odpowiednio krzywe pierwszego i drugiego ogrzewania, natomiast B to krzywa chłodzenia.

Kwas acetylosalicylowy z hypromelozą

Diagram fazowy obrazujący stan równowagi w mieszaninie ASA z HPMC zawiera krzywe rozpuszczalności i mieszalności (Rys. 30). Wartości liczbowe wykorzystane do wyznaczenia tych krzywych zestawiono odpowiednio w Tabelach 28 i 29. Ilość ASA, która w temp. 20°C może ulec rozpuszczeniu w HPMC jest niewielka, nie przekracza bowiem 2,08%. W temp. 100°C ilość ta może osiągnąć ok. 30%, natomiast w temperaturze topnienia ASA stanowi ok. 80%.

Do wykreślenia krzywej mieszalności wykorzystano jedynie zakres temperatur mieszczący się w przedziale od 0°C do temperatury topnienia ASA. Wartości te zaznaczono w Tabeli 29 pogrubioną czcionką. Krzywa mieszalności przecina oś odciętych przy zawartości ok. 9% ASA. Przesunięcie krzywej kalibracji względem początku układu współrzędnych wyniosło 6,87 J/g (Tabela 13), co odpowiada zawartości 4,06% ASA, obliczonej na podstawie entalpii topnienia ASA (169,36 J/g). Podobnie jak w przypadku mieszanin PAR z HPMC, trudność stanowi odniesienie krzywej mieszalności do warunków, które osiągnięte zostały w trakcie homogenizacji, szczególnie pod względem wielkości kryształów ASA. Dodatkowo, w przypadku mieszanin zawierających ASA, trudna jest ocena, w jaki sposób na stan równowagi wpływają powstające w trakcie deacetylacji kwasy octowy i salicylowy.



Rys. 30. Diagram fazowy dla dwuskładnikowej mieszaniny ASA z HPMC.

Tabela 28. Dane charakteryzujące rozpuszczalność ASA w HPMC, w zależności od temperatury mieszaniny.

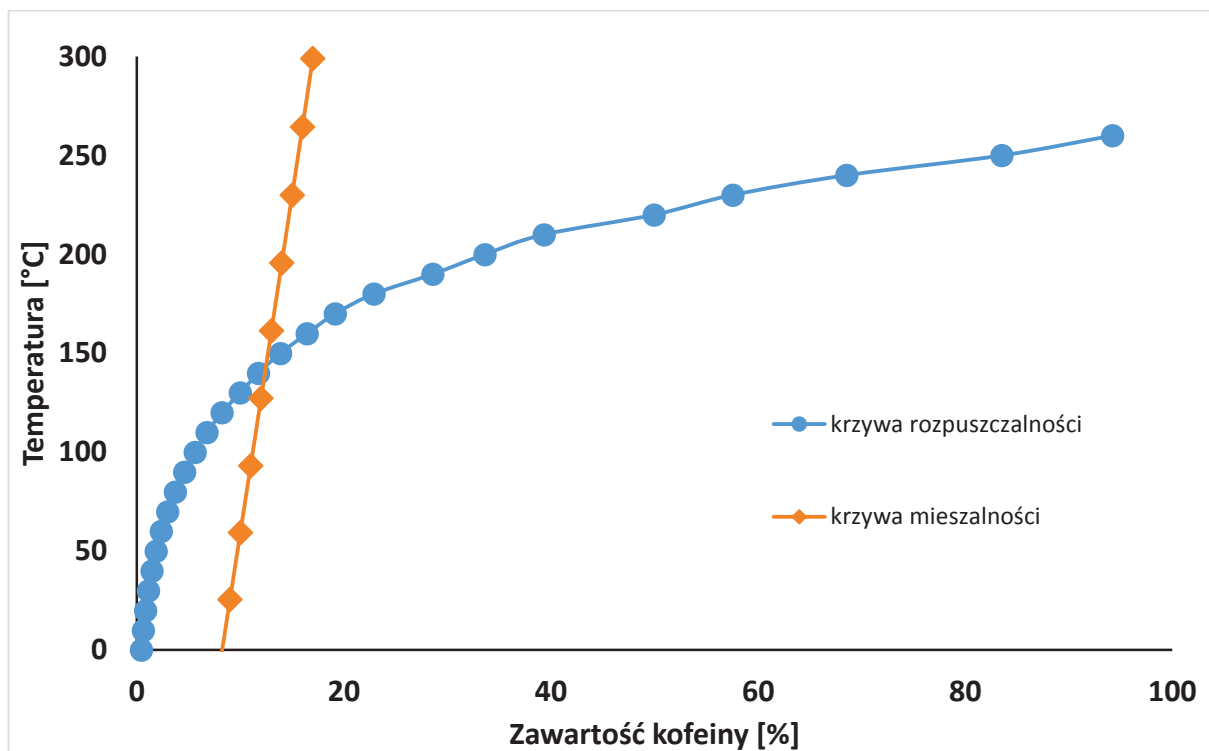
Zawartość ASA w mieszaninie [%]	Ilość ASA, która może ulec rozpuszczeniu w HPMC														
	Temperatura [°C]														
	0	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110	120	130	140
95	0,83	1,34	2,08	3,15	4,64	6,68	9,40	12,97	17,58	23,43	30,74	39,76	50,77	64,04	79,88
90	0,80	1,29	2,01	3,04	4,48	6,44	9,06	12,50	16,93	22,55	29,58	38,27	48,85	61,61	
85	0,77	1,24	1,93	2,92	4,30	6,18	8,70	12,00	16,26	21,66	28,41	36,74	46,90	59,14	
80	0,74	1,19	1,85	2,80	4,12	5,92	8,34	11,50	15,58	20,75	27,22	35,20	44,94	56,67	
75	0,70	1,13	1,77	2,67	3,94	5,66	7,97	11,00	14,90	19,85	26,04	33,68	43,00	54,23	
70	0,67	1,08	1,68	2,55	3,75	5,40	7,60	10,49	14,22	18,95	24,87	32,17	41,08	51,83	
65	0,64	1,03	1,60	2,42	3,57	5,14	7,25	10,00	13,56	18,07	23,72	30,70	39,21	49,48	
60	0,60	0,97	1,52	2,30	3,40	4,89	6,89	9,52	12,91	17,22	22,61	29,27	37,39	47,20	
55	0,57	0,92	1,44	2,18	3,23	4,65	6,55	9,05	12,28	16,39	21,53	27,88	35,64	45,00	
50	0,54	0,87	1,36	2,07	3,06	4,41	6,22	8,60	11,68	15,59	20,49	26,54	33,94		
45	0,51	0,83	1,29	1,96	2,90	4,18	5,90	8,17	11,09	14,82	19,48	25,26	32,32		
40	0,48	0,78	1,22	1,86	2,74	3,96	5,60	7,75	10,54	14,08	18,53	24,03	30,76		
35	0,45	0,74	1,15	1,75	2,60	3,75	5,31	7,35	10,00	13,38	17,61	22,86	29,27		
30	0,43	0,69	1,09	1,66	2,46	3,56	5,03	6,98	9,49	12,70	16,74	21,74	27,85		
25	0,40	0,65	1,03	1,57	2,33	3,37	4,77	6,61	9,01	12,07	15,91	20,67			
20	0,38	0,62	0,97	1,48	2,20	3,19	4,52	6,27	8,55	11,46	15,12				
19	0,38	0,61	0,96	1,46	2,17	3,15	4,47	6,21	8,46	11,34					
18	0,37	0,60	0,95	1,45	2,15	3,12	4,42	6,14	8,37	11,23					
17	0,37	0,60	0,94	1,43	2,13	3,08	4,37	6,08	8,29	11,11					
16	0,36	0,59	0,93	1,41	2,10	3,05	4,33	6,01	8,20	11,00					
15	0,36	0,58	0,92	1,40	2,08	3,02	4,28	5,95	8,12	10,89					
14	0,35	0,57	0,91	1,38	2,06	2,98	4,23	5,89	8,03	10,77					
13	0,35	0,57	0,89	1,37	2,03	2,95	4,19	5,82	7,95						
12	0,34	0,56	0,88	1,35	2,01	2,92	4,14	5,76	7,87						
11	0,34	0,55	0,87	1,34	1,99	2,89	4,10	5,70	7,78						
10	0,34	0,55	0,86	1,32	1,97	2,86	4,06	5,64	7,70						
9	0,33	0,54	0,85	1,31	1,94	2,82	4,01	5,58							
8	0,33	0,54	0,84	1,29	1,92	2,79	3,97	5,52							
7	0,32	0,53	0,83	1,28	1,90	2,76	3,93	5,47							
6	0,32	0,52	0,82	1,26	1,88	2,73	3,88								
5	0,32	0,52	0,82	1,25	1,86	2,70	3,84								
4	0,31	0,51	0,81	1,23	1,84	2,67									
3	0,31	0,50	0,80	1,22	1,82	2,65									
2	0,31	0,50	0,79	1,21	1,80										

Tabela 29. Wartości temperatur mieszalności dla mieszanin ASA z HPMC.

Zawartość ASA w mieszaninie [%]	Ułamek molowy (x)		Ułamek objętościowy (φ)		Temperatura pełnej mieszalności składników [°C]
	ASA	HPMC	ASA	HPMC	
95	0,9992	0,0008	0,938	0,062	3447,79
90	0,9983	0,0017	0,877	0,123	2837,69
85	0,9973	0,0027	0,818	0,182	2516,27
80	0,9962	0,0038	0,760	0,240	2262,60
75	0,9950	0,0050	0,704	0,296	2038,85
70	0,9936	0,0064	0,649	0,351	1832,92
65	0,9919	0,0081	0,596	0,404	1639,64
60	0,9900	0,0100	0,543	0,457	1456,29
55	0,9878	0,0122	0,492	0,508	1281,29
50	0,9851	0,0149	0,442	0,558	1113,57
45	0,9819	0,0181	0,394	0,606	952,38
40	0,9778	0,0222	0,346	0,654	797,14
35	0,9727	0,0273	0,299	0,701	647,40
30	0,9659	0,0341	0,254	0,746	502,78
25	0,9566	0,0434	0,209	0,791	362,96
20	0,9430	0,0570	0,166	0,834	227,64
19	0,9395	0,0605	0,157	0,843	201,10
18	0,9356	0,0644	0,148	0,852	174,72
17	0,9313	0,0687	0,140	0,860	148,51
16	0,9265	0,0735	0,131	0,869	122,47
15	0,9211	0,0789	0,123	0,877	96,59
14	0,9150	0,0850	0,114	0,886	70,87
13	0,9081	0,0919	0,106	0,894	45,31
12	0,9002	0,0998	0,098	0,902	19,91
11	0,8910	0,1090	0,089	0,911	-5,34
10	0,8802	0,1198	0,081	0,919	-30,43
9	0,8674	0,1326	0,073	0,927	-55,36
8	0,8519	0,1481	0,065	0,935	-80,15
7	0,8328	0,1672	0,056	0,944	-104,78
6	0,8085	0,1915	0,048	0,952	-129,27
5	0,7769	0,2231	0,040	0,960	-153,61
4	0,7338	0,2662	0,032	0,968	-177,80
3	0,6717	0,3283	0,024	0,976	-201,85
2	0,5745	0,4255	0,016	0,984	-225,76

Kofeina z hypromelozą

Na Rys. 31 przedstawiono diagram fazowy, wyznaczony na podstawie danych zestawionych w Tabelach 30 i 31, obrazujący stan równowagi w mieszaninie KOF z HPMC. Krzywą mieszalności wykreślono w zakresie temperatur od 0°C do temperatury topnienia KOF (Tabela 31). Rozpuszczalność KOF w HPMC w temp. 20°C jest niewielka i nie przekracza 2,05%, natomiast w temp. 100°C jest to ilość nie większa niż 12,7%. W temp. 230°C wartość ta wynosi maksymalnie 71,2%. Również w przypadku tych mieszanin trudna do oszacowania jest rzeczywista ilość KOF, która w temperaturze sporządzenia mieszanin wzorcowych mogła ulec rozpuszczeniu w HPMC oraz stopień uzyskania dobrej mieszalności składników.



Rys. 31. Diagram fazowy dla dwuskładnikowej mieszaniny KOF z HPMC.

Tabela 30. Dane charakteryzujące rozpuszczalność KOF w HPMC, w zależności od temperatury mieszaniny.

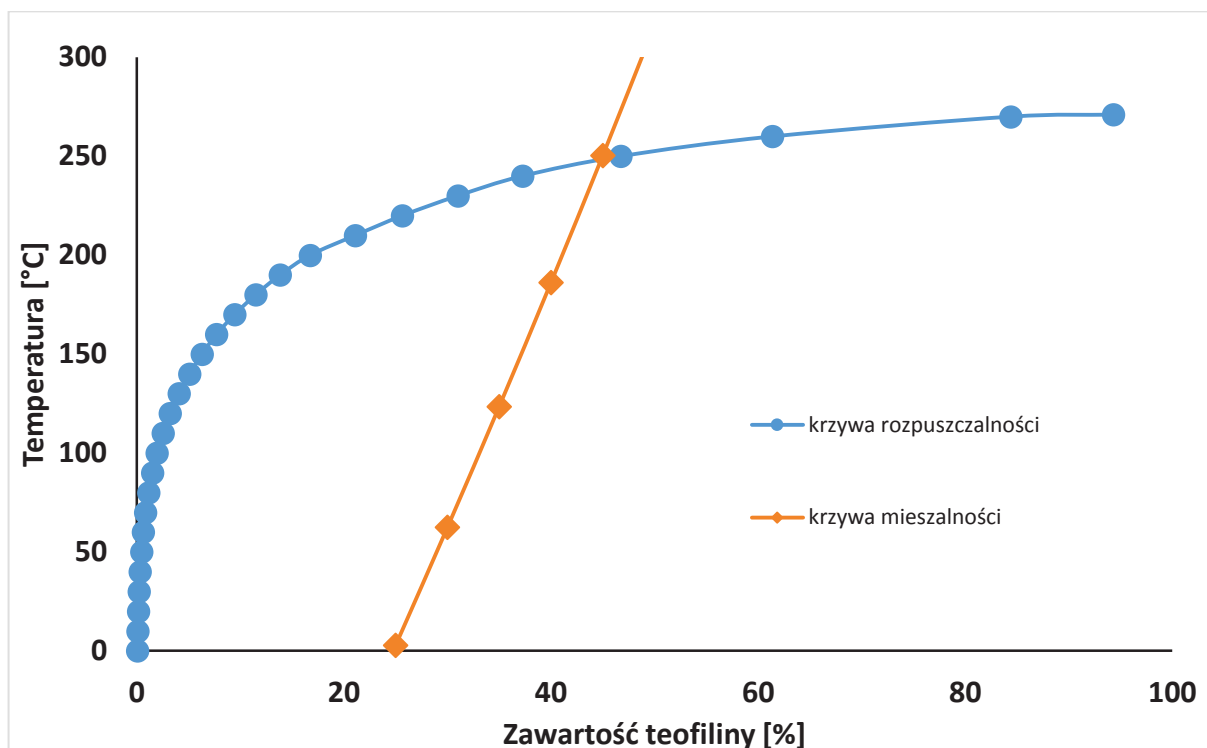
Zawartość KOF w mieszaninie [%]	Ilość KOF, która może ulec rozpuszczeniu w HPMC																							
	Temperatura [°C]																							
	0	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110	120	130	140	150	160	170	180	190	200	210	220	230
95	1,10	1,52	2,05	2,72	3,53	4,52	5,70	7,08	8,70	10,5	12,7	15,1	17,8	20,8	24,2	27,9	32,0	36,4	38,4	46,4	52,0	58,0	64,4	71,3
90	1,08	1,49	2,02	2,67	3,46	4,43	5,57	6,93	8,50	10,3	12,3	14,7	17,3	20,3	23,6	27,2	31,1	35,4	40,1	45,1	50,5	56,3	62,5	69,1
85	1,06	1,46	1,97	2,60	3,38	4,31	5,43	6,74	8,27	10,0	12,0	14,3	16,8	19,7	22,9	26,4	30,2	34,3	38,8	43,7	49,0	54,6	60,5	66,9
80	1,03	1,42	1,92	2,53	3,28	4,19	5,27	6,54	8,02	9,73	11,6	13,8	16,3	19,1	22,1	25,5	29,2	33,2	37,6	42,3	47,3	52,7	58,5	64,6
75	1,00	1,38	1,85	2,45	3,18	4,05	5,10	6,33	7,75	9,40	11,2	13,4	15,7	18,4	21,4	24,6	28,1	32,0	36,2	40,7	45,6	50,8	56,4	62,3
70	0,97	1,33	1,79	2,36	3,06	3,91	4,91	6,09	7,47	9,05	10,8	12,9	15,2	17,7	20,6	23,7	27,1	30,8	34,8	39,2	43,9	48,9	54,2	59,9
65	0,93	1,28	1,72	2,27	2,94	3,75	4,72	5,86	7,18	8,70	10,4	12,4	14,6	17,0	19,7	22,7	26,0	29,6	33,5	37,6	42,1	46,9	52,1	57,5
60	0,89	1,22	1,65	2,17	2,82	3,59	4,52	5,61	6,88	8,33	10,0	11,8	13,9	16,3	18,9	21,8	24,9	28,4	32,1	36,1	40,4	45,0	49,9	
55	0,85	1,17	1,57	2,07	2,69	3,43	4,32	5,36	6,57	7,96	9,56	11,3	13,3	15,6	18,1	20,8	23,8	27,1	30,7	34,5	38,6	43,1		
50	0,81	1,11	1,50	1,97	2,56	3,27	4,12	5,11	6,26	7,60	9,12	10,8	12,7	14,9	17,3	19,9	22,8	25,9	29,3	33,0	36,9	41,1		
45	0,76	1,05	1,42	1,88	2,43	3,11	3,91	4,86	5,96	7,23	8,68	10,3	12,1	14,2	16,5	19,0	21,7	24,7	28,0	31,5	35,2	39,3		
40	0,72	1,00	1,34	1,78	2,31	2,95	3,71	4,61	5,66	6,87	8,25	9,81	11,5	13,5	15,7	18,0	20,7	23,5	26,6	30,0	33,6			
35	0,68	0,94	1,27	1,68	2,18	2,79	3,51	4,37	5,36	6,51	7,82	9,31	10,9	12,8	14,9	17,2	19,6	22,4	25,3	28,5				
30	0,64	0,89	1,20	1,58	2,06	2,63	3,32	4,13	5,07	6,16	7,41	8,82	10,4	12,1	14,1	16,3	18,7	21,3	24,1					
25	0,60	0,83	1,12	1,49	1,94	2,48	3,13	3,90	4,79	5,83	7,01	8,35	9,86	11,5	13,4	15,4	17,7	20,2	22,8					
20	0,56	0,78	1,05	1,40	1,82	2,34	2,95	3,68	4,52	5,50	6,62	7,89	9,32	10,9	12,7	14,6	16,8	19,1						
19	0,56	0,77	1,04	1,38	1,80	2,31	2,91	3,63	4,47	5,44	6,54	7,80	9,22	10,8	12,5	14,5	16,6							
18	0,55	0,76	1,03	1,36	1,78	2,28	2,88	3,59	4,42	5,37	6,47	7,71	9,11	10,6	12,4	14,3	16,4							
17	0,54	0,75	1,01	1,35	1,76	2,25	2,84	3,54	4,36	5,31	6,39	7,62	9,01	10,5	12,2	14,1								
16	0,53	0,74	1,00	1,33	1,73	2,22	2,81	3,50	4,31	5,25	6,32	7,53	8,91	10,4	12,1	14,0								
15	0,53	0,73	0,99	1,31	1,71	2,20	2,77	3,46	4,26	5,18	6,24	7,45	8,80	10,3	12,0	13,8								
14	0,52	0,72	0,98	1,30	1,69	2,17	2,74	3,42	4,21	5,12	6,17	7,36	8,70	10,2	11,8									
13	0,51	0,71	0,96	1,28	1,67	2,14	2,71	3,38	4,16	5,06	6,10	7,28	8,60	10,0	11,7									
12	0,51	0,70	0,95	1,26	1,65	2,11	2,67	3,33	4,11	5,00	6,03	7,19	8,50	9,97										
11	0,50	0,69	0,94	1,25	1,63	2,09	2,64	3,29	4,06	4,94	5,95	7,11	8,41											
10	0,49	0,68	0,92	1,23	1,60	2,06	2,61	3,25	4,01	4,88	5,88	7,02	8,31											
9	0,48	0,67	0,91	1,21	1,58	2,03	2,57	3,21	3,96	4,82	5,81	6,94	8,21											
8	0,48	0,66	0,90	1,20	1,56	2,01	2,54	3,17	3,91	4,76	5,74	6,86												
7	0,47	0,65	0,89	1,18	1,54	1,98	2,51	3,13	3,86	4,71	5,68	6,78												
6	0,46	0,64	0,88	1,17	1,52	1,96	2,48	3,09	3,81	4,65	5,61													
5	0,46	0,64	0,86	1,15	1,50	1,93	2,45	3,05	3,77	4,59														
4	0,45	0,63	0,85	1,13	1,48	1,91	2,41	3,02	3,72															
3	0,44	0,62	0,84	1,12	1,46	1,88	2,38	2,98																
2	0,44	0,61	0,83	1,10	1,44	1,86	2,35																	

Tabela 31. Wartości temperatur mieszalności dla mieszanin KOF z HPMC.

Zawartość KOF w mieszaninie [%]	Ułamek molowy (x)		Ułamek objętościowy (ϕ)		Temperatura pełnej mieszalności składników [°C]
	KOF	HPMC	KOF	HPMC	
95	0,9992	0,0008	0,938	0,062	2761,13
90	0,9983	0,0017	0,877	0,123	2896,27
85	0,9973	0,0027	0,818	0,182	2805,03
80	0,9962	0,0038	0,760	0,240	2650,45
75	0,9950	0,0050	0,704	0,296	2471,46
70	0,9936	0,0064	0,649	0,351	2282,01
65	0,9919	0,0081	0,596	0,404	2088,28
60	0,9900	0,0100	0,543	0,457	1893,40
55	0,9878	0,0122	0,492	0,508	1699,07
50	0,9851	0,0149	0,442	0,558	1506,29
45	0,9819	0,0181	0,394	0,606	1315,67
40	0,9778	0,0222	0,346	0,654	1127,57
35	0,9727	0,0273	0,299	0,701	942,21
30	0,9659	0,0341	0,254	0,746	759,72
25	0,9566	0,0434	0,209	0,791	580,18
20	0,9430	0,0570	0,166	0,834	403,61
19	0,9395	0,0605	0,157	0,843	368,65
18	0,9356	0,0644	0,148	0,852	333,81
17	0,9313	0,0687	0,140	0,860	299,09
16	0,9265	0,0735	0,131	0,869	264,49
15	0,9211	0,0789	0,123	0,877	230,01
14	0,9150	0,0850	0,114	0,886	195,65
13	0,9081	0,0919	0,106	0,894	161,40
12	0,9002	0,0998	0,098	0,902	127,28
11	0,8910	0,1090	0,089	0,911	93,27
10	0,8802	0,1198	0,081	0,919	59,38
9	0,8674	0,1326	0,073	0,927	25,60
8	0,8519	0,1481	0,065	0,935	-8,06
7	0,8328	0,1672	0,056	0,944	-41,60
6	0,8085	0,1915	0,048	0,952	-75,02
5	0,7769	0,2231	0,040	0,960	-108,33
4	0,7338	0,2662	0,032	0,968	-141,53
3	0,6717	0,3283	0,024	0,976	-174,60
2	0,5745	0,4255	0,016	0,984	-207,57

Teofilina z hypromelozą

Na Rys. 32 przedstawiono diagram fazowy prognozujący rozpuszczalność oraz mieszalność TF z HPMC. Wartości liczbowe wykorzystane do opracowania diagramu fazowego zestawiono w Tabelach 32 i 33.



Rys. 32. Diagram fazowy dla dwuskładnikowej mieszaniny TF z HPMC.

Podobnie, jak w przypadku wcześniej charakteryzowanych substancji leczniczych, ilość TF, która w temp. 20°C może ulec rozpuszczeniu w HPMC jest niewielka, stanowi jedynie 0,45%, w temp. 100°C stanowi nie więcej niż 5,4%, jest więc mniejsza w porównaniu z wcześniej badanymi substancjami czynnymi. W temp. 230°C ilość ta wynosi maksymalnie 93,2%. Krzywa mieszalności przecina oś odciętych przy zawartości TF ok. 25%. Przesunięcie krzywych kalibracji względem początku układu współrzędnych wyniosło 19,97 J/g i 20,86 J/g, odpowiednio dla mieszanin TF z HPMC homogenizowanych pistlem i kartą celuloidową (Tabela 17). Odpowiada to odpowiednio 12,82% i 13,39% wartości entalpii topnienia TF (155,75 J/g).

W przypadku mieszanin TF z HPMC, rzeczywista ocena ilościowa rozpuszczania i mieszalności składników wymagałaby danych odnośnie temperatury, jaka została osiągnięta w trakcie homogenizacji mieszanin oraz wielkości kryształów TF. Podobnie, oszacowanie tych ilości w handlowych produktach farmaceutycznych wymagałoby dysponowania danymi o temperaturze, jaka występowała w trakcie procesów technologicznych. Dodatkowo, konieczne byłoby uwzględnienie ewentualnego wpływu wszystkich substancji pomocniczych użytych do produkcji tych preparatów, na stan równowagi w mieszaninie tabletkowej.

Tabela 32. Dane charakteryzujące rozpuszczalność KOF w HPMC, w zależności od temperatury mieszaniny.

Zawartość TF w mieszaninie [%]	Ilość TF, która może ulec rozpuszczeniu w HPMC																											
	Temperatura [°C]																											
	0	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110	120	130	140	150	160	170	180	190	200	210	220	230	240	250	260	270
95	0,19	0,30	0,45	0,66	0,94	1,31	1,80	2,43	3,21	4,19	5,38	6,83	8,55	10,6	13,0	15,7	19,0	22,7	20,8	31,6	36,9	42,8	49,4	56,6	64,6	73,3	82,8	93,2
90	0,18	0,28	0,42	0,62	0,89	1,25	1,71	2,30	3,05	3,98	5,11	6,49	8,13	10,0	12,3	15,0	18,0	21,5	25,5	30,0	35,1	40,7	47,0	53,9	61,5	69,8	78,8	88,7
85	0,17	0,27	0,40	0,59	0,84	1,18	1,62	2,18	2,89	3,77	4,85	6,16	7,72	9,57	11,7	14,2	17,1	20,5	24,2	28,5	33,3	38,7	44,6	51,2	58,4	66,4	75,0	
80	0,16	0,25	0,38	0,56	0,80	1,12	1,54	2,07	2,74	3,58	4,60	5,84	7,32	9,08	11,1	13,5	16,3	19,4	23,0	27,1	31,7	36,8	42,4	48,7	55,6	63,1	71,3	
75	0,15	0,24	0,36	0,53	0,75	1,06	1,45	1,96	2,60	3,39	4,36	5,53	6,94	8,61	10,5	12,8	15,4	18,4	21,9	25,7	30,1	34,9	40,3	46,3	52,8	60,0	67,8	
70	0,14	0,22	0,34	0,50	0,71	1,00	1,37	1,85	2,45	3,20	4,12	5,24	6,57	8,16	10,0	12,1	14,6	17,5	20,8	24,4	28,6	33,2	38,3	44,0	50,2	57,0	64,5	
65	0,14	0,21	0,32	0,47	0,67	0,94	1,30	1,75	2,32	3,03	3,90	4,96	6,23	7,73	9,49	11,5	13,9	16,6	19,7	23,2	27,1	31,5	36,4	41,8	47,7	54,2	61,3	
60	0,13	0,20	0,30	0,44	0,63	0,89	1,22	1,65	2,19	2,87	3,69	4,69	5,90	7,32	9,00	10,9	13,2	15,7	18,7	22,0	25,8	29,9	34,6	39,7	45,4	51,6		
55	0,12	0,19	0,28	0,42	0,60	0,84	1,15	1,56	2,07	2,71	3,49	4,44	5,58	6,94	8,53	10,3	12,5	14,9	17,7	20,9	24,5	28,5	32,9	37,8	43,2	49,1		
50	0,11	0,17	0,27	0,39	0,56	0,79	1,09	1,47	1,96	2,56	3,30	4,20	5,28	6,57	8,08	9,84	11,8	14,2	16,8	19,9	23,2	27,0	31,3	35,9	41,1	46,7		
45	0,11	0,16	0,25	0,37	0,53	0,74	1,03	1,39	1,85	2,42	3,12	3,98	5,00	6,22	7,66	9,33	11,2	13,5	16,0	18,9	22,1	25,7	29,7	34,2	39,1			
40	0,10	0,15	0,23	0,35	0,50	0,70	0,97	1,31	1,74	2,29	2,95	3,76	4,74	5,90	7,26	8,85	10,6	12,8	15,2	17,9	21,0	24,4	28,3	32,5	37,2			
35	0,09	0,14	0,22	0,32	0,47	0,66	0,91	1,24	1,65	2,16	2,79	3,56	4,49	5,59	6,88	8,40	10,1	12,1	14,4	17,0	20,0	23,2	26,9	31,0				
30	0,09	0,14	0,21	0,31	0,44	0,62	0,86	1,17	1,56	2,04	2,64	3,37	4,25	5,29	6,53	7,97	9,64	11,5	13,7	16,2	19,0	22,1	25,6					
25	0,08	0,13	0,19	0,29	0,42	0,59	0,81	1,10	1,47	1,93	2,50	3,19	4,03	5,02	6,19	7,56	9,15	10,9	13,0	15,4	18,1	21,1						
20	0,08	0,12	0,18	0,27	0,39	0,55	0,77	1,04	1,39	1,83	2,37	3,02	3,82	4,76	5,88	7,18	8,69	10,4	12,4	14,6	17,2							
19	0,07	0,12	0,18	0,27	0,39	0,55	0,76	1,03	1,37	1,81	2,34	2,99	3,77	4,71	5,81	7,11	8,61	10,3	12,3	14,5	17,0							
18	0,07	0,12	0,18	0,26	0,38	0,54	0,75	1,02	1,36	1,79	2,31	2,96	3,73	4,66	5,75	7,03	8,52	10,2	12,1	14,4	16,9							
17	0,07	0,11	0,18	0,26	0,38	0,53	0,74	1,01	1,34	1,77	2,29	2,93	3,69	4,61	5,69	6,96	8,43	10,1	12,0	14,2	16,7							
16	0,07	0,11	0,17	0,26	0,37	0,53	0,73	0,99	1,33	1,75	2,26	2,89	3,66	4,56	5,64	6,89	8,35	10,0	11,9	14,1								
15	0,07	0,11	0,17	0,25	0,37	0,52	0,72	0,98	1,31	1,73	2,24	2,86	3,62	4,52	5,58	6,82	8,26	9,92	11,8	13,9								
14	0,07	0,11	0,17	0,25	0,36	0,51	0,71	0,97	1,30	1,71	2,22	2,83	3,58	4,47	5,52	6,75	8,18	9,83	11,7	13,8								
13	0,07	0,11	0,17	0,25	0,36	0,51	0,71	0,96	1,28	1,69	2,19	2,80	3,54	4,42	5,46	6,68	8,10	9,73	11,5									
12	0,07	0,11	0,16	0,24	0,36	0,50	0,70	0,95	1,27	1,67	2,17	2,77	3,50	4,38	5,41	6,61	8,02	9,63	11,4									
11	0,07	0,11	0,16	0,24	0,35	0,50	0,69	0,94	1,26	1,65	2,14	2,74	3,47	4,33	5,35	6,55	7,94	9,54										
10	0,07	0,11	0,16	0,24	0,35	0,49	0,68	0,93	1,24	1,63	2,12	2,71	3,43	4,29	5,30	6,48	7,86	9,44										
9	0,07	0,10	0,16	0,24	0,34	0,49	0,67	0,92	1,23	1,62	2,10	2,69	3,39	4,24	5,24	6,42	7,78											
8	0,06	0,10	0,16	0,23	0,34	0,48	0,67	0,91	1,21	1,60	2,08	2,66	3,36	4,20	5,19	6,35	7,70											
7	0,06	0,10	0,15	0,23	0,33	0,47	0,66	0,90	1,20	1,58	2,05	2,63	3,32	4,15	5,14	6,29												
6	0,06	0,10	0,15	0,23	0,33	0,47	0,65	0,89	1,19	1,56	2,03	2,60	3,29	4,11	5,08													
5	0,06	0,10	0,15	0,22	0,33	0,46	0,64	0,88	1,17	1,55	2,01	2,57	3,26	4,07														
4	0,06	0,10	0,15	0,22	0,32	0,46	0,64	0,87	1,16	1,53	1,99	2,55	3,22															
3	0,06	0,10	0,15	0,22	0,32	0,45	0,63	0,86	1,15	1,51	1,97	2,52																
2	0,06	0,09	0,15	0,22	0,32	0,45	0,62	0,85	1,14	1,50	1,95																	

Tabela 33. Wartości temperatur mieszalności dla mieszanin TF z HPMC.

Zawartość TF w mieszaninie [%]	Ułamek molowy (x)		Ułamek objętościowy (Φ)		Temperatura pełnej mieszalności składników [°C]
	TF	HPMC	TF	HPMC	
95	0,9992	0,0008	0,938	0,062	826,13
90	0,9983	0,0017	0,877	0,123	843,60
85	0,9973	0,0027	0,818	0,182	796,38
80	0,9962	0,0038	0,760	0,240	732,70
75	0,9950	0,0050	0,704	0,296	663,56
70	0,9936	0,0064	0,649	0,351	592,81
65	0,9919	0,0081	0,596	0,404	522,08
60	0,9900	0,0100	0,543	0,457	452,15
55	0,9878	0,0122	0,492	0,508	383,43
50	0,9851	0,0149	0,442	0,558	316,13
45	0,9819	0,0181	0,394	0,606	250,35
40	0,9778	0,0222	0,346	0,654	186,13
35	0,9727	0,0273	0,299	0,701	123,49
30	0,9659	0,0341	0,254	0,746	62,41
25	0,9566	0,0434	0,209	0,791	2,87
20	0,9430	0,0570	0,166	0,834	-55,18
19	0,9395	0,0605	0,157	0,843	-66,61
18	0,9356	0,0644	0,148	0,852	-77,98
17	0,9313	0,0687	0,140	0,860	-89,30
16	0,9265	0,0735	0,131	0,869	-100,56
15	0,9211	0,0789	0,123	0,877	-111,76
14	0,9150	0,0850	0,114	0,886	-122,90
13	0,9081	0,0919	0,106	0,894	-133,99
12	0,9002	0,0998	0,098	0,902	-145,02
11	0,8910	0,1090	0,089	0,911	-156,00
10	0,8802	0,1198	0,081	0,919	-166,92
9	0,8674	0,1326	0,073	0,927	-177,78
8	0,8519	0,1481	0,065	0,935	-188,59
7	0,8328	0,1672	0,056	0,944	-199,35
6	0,8085	0,1915	0,048	0,952	-210,05
5	0,7769	0,2231	0,040	0,960	-220,70
4	0,7338	0,2662	0,032	0,968	-231,30
3	0,6717	0,3283	0,024	0,976	-241,84
2	0,5745	0,4255	0,016	0,984	-252,33

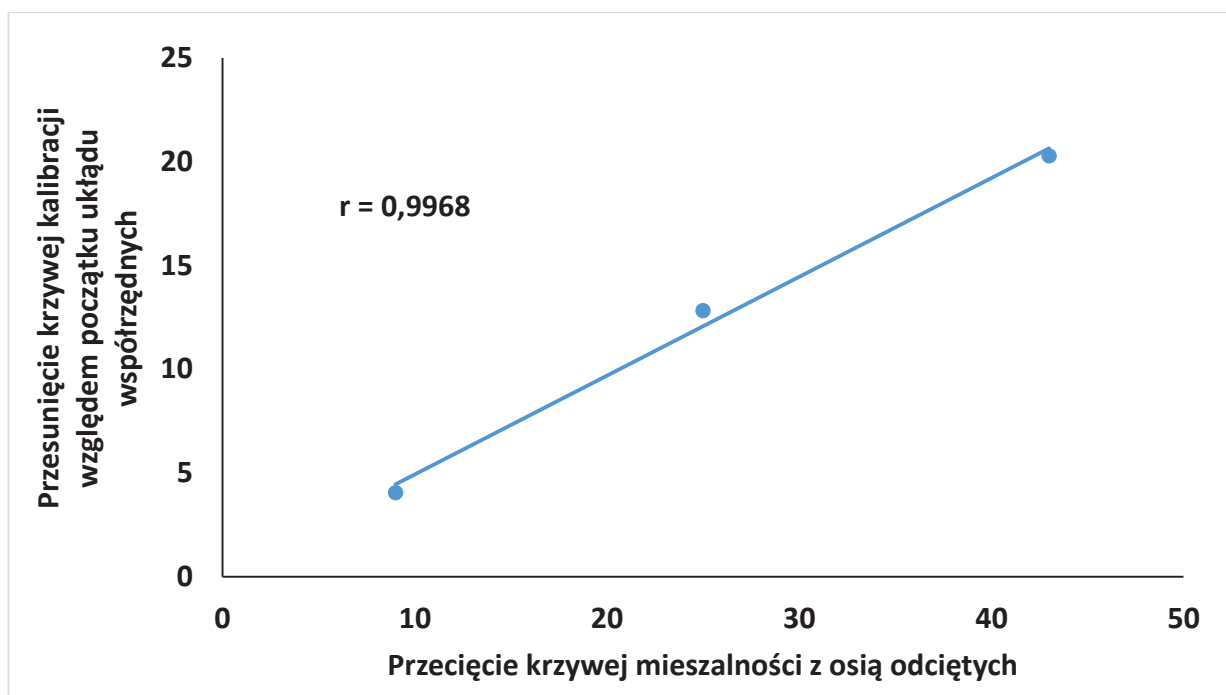
4.6 Podsumowanie

Podczas badań DSC mieszanin PAR, ASA, KOF i TF z wybranymi substancjami pomocniczymi wykazano, że entalpia topnienia substancji leczniczej w kontakcie z substancją pomocniczą może ulec obniżeniu w porównaniu z wartością uzyskaną dla tej samej substancji czynnej użytej jako wzorzec. Zjawisko to dotyczy w szczególności mieszanin zawierających HPMC. Obniżenie entalpii topnienia substancji leczniczej w mieszaninie z polimerem może wynikać z oddziaływań fizycznych pomiędzy składnikami, związanymi z wzajemnym rozpuszczaniem i mieszaniem. Opracowane diagramy fazowe dla mieszanin badanych substancji z HPMC wskazują obszary, w których ilość substancji czynnej w warunkach założonej

temperatury i składu mieszanin może ulec rozpuszczeniu w polimerze oraz może utworzyć mieszaninę o wzajemnej, nieograniczonej mieszalności składników.

Tabela 34. Wartości wykorzystane do obliczeń korelacji pomiędzy przesunięciem krzywej kalibracji a mieszalnością substancji leczniczej z HPMC.

Substancja czynna	Entalpia topnienia [J/g]	Przesunięcie krzywej kalibracji (b) [J/g]	Ilość substancji, której odpowiada przesunięcie krzywej kalibracji (A) [%]	Przecięcie krzywej mieszalności z osią odciętych (B) [%]	A/B
PAR	184,70	37,45	20,28	43	0,47
ASA	169,36	6,87	4,06	9	0,45
TF	155,75	19,97	12,82	25	0,51



Rys. 33. Krzywa korelacji pomiędzy przesunięciem krzywej kalibracji względem początku układu współrzędnych a przecięciem krzywej mieszalności z osią odciętych.

Stwierdzono zależność pomiędzy punktem przecięcia krzywej mieszalności z osią odciętych a przesunięciem względem początku układu współrzędnych krzywej zależności entalpii topnienia od zawartości PAR, TF i ASA w mieszaninach z HPMC, przygotowanych w celu sporządzenia krzywych kalibracji do oznaczania tych analitów w handlowych preparatach farmaceutycznych (Rys. 33). Wartości wykorzystane do wykreślenia krzywej korelacji zestawiono w Tabeli 34. W przypadku PAR i KOF, do poszukiwania zależności wykorzystano

wartości uzyskane dla krzywych mieszanin homogenizowanych pistlem. Stosunek ilości substancji czynnej, której odpowiada przesunięcie krzywej kalibracji, do przecięcia krzywej mieszalności z osią odciętych, obliczona dla poszczególnych substancji czynnych, była zbliżona i wyniosła średnio 0,48.

Wyniki przedstawione w rozdziale 1 (Wyniki badań i dyskusja) nad przydatnością DSC do oceny składu ilościowego preparatów farmaceutycznych wskazują na błąd systematyczny, wynikający z utraty krystaliczności przez część substancji czynnej. Przyczyną uzyskania krzywych kalibracji obarczonych błędem systematycznym jest wynikająca z oddziaływań substancji czynnej z polimerem, wzajemna rozpuszczalność i mieszalność składników, co potwierdzają diagramy fazowe. Oddziaływania te są również przyczyną niepowodzenia w wykorzystaniu DSC w oznaczaniu substancji czynnej w handlowych preparatach farmaceutycznych.

WNIOSKI

Wyniki przeprowadzonych badań wskazują, że możliwe jest wykorzystanie DSC do identyfikacji substancji czynnych lub pomocniczych oraz potwierdzenia ich tożsamości na podstawie temperatury i entalpii topnienia lub temperatury innych przemian fazowych, jak przemiany szkliste lub polimorficzne. Umożliwia to nie tylko potwierdzenie tożsamości substancji, ale również jednoznaczne określenie jej formy krystalicznej. Dotyczy to jednak przypadków, w których nie zachodzi interakcja pomiędzy substancją leczniczą i składnikami masy tabletkowej. W niektórych przypadkach możliwe jest bowiem przesunięcie pików topnienia w kierunku niższych temperatur oraz ich poszerzenie, spowodowane utworzeniem eutektyku.

Mimo zadowalającej liniowości krzywych kalibracji, przedstawiających zależność entalpii topnienia substancji leczniczej od jej zawartości w mieszaninie, przydatność DSC w analizie ilościowej jest ograniczona. Dla większości wzorcowych matryc tabletkowych stwierdzono przesunięcie krzywych kalibracji względem początku układu współrzędnych. W niektórych przypadkach przesunięcie to było mniejsze dla mieszanin homogenizowanych delikatnie za pomocą karty celuloidowej. Potwierdza to fakt utraty krystaliczności przez część substancji leczniczej w kontakcie z niektórymi substancjami pomocniczymi.

W związku z powyższym, zgodność uzyskanych za pomocą DSC wyników oznaczeń zawartości substancji leczniczych w handlowych preparatach farmaceutycznych z wartością deklarowaną przez producenta, była przypadkowa. Zastosowanie metody wielokrotnego dodatku wzorca, które miało na celu eliminację wpływu matrycy na wynik oznaczenia, nie doprowadziło do uzyskania zadowalających wyników.

Badania nad oddziaływaniami międzycząsteczkowymi pomiędzy PAR, ASA, KOF i TF a HPMC wskazały na brak interakcji chemicznej pomiędzy substancjami leczniczymi i polimerem. Korzystając z metod spektroskopowych (FTIR, Raman) nie stwierdzono również tworzenia wiązań wodorowych pomiędzy składnikami mieszanin, pomimo, iż wybrane do badań substancje lecznicze i HPMC zdolne są do tworzenia takich wiązań.

Analiza termomikroskopowa wszystkich badanych substancji czynnych i HPMC oraz ich mieszanin wykazała, że w podwyższonej temperaturze sublimują PAR, TF i KOF oraz obserwuje się deacetylację ASA. Uwalnianie kwasu octowego potwierdzono również za pomocą widm spektroskopowych.

Opracowane diagramy fazowe opisują stan równowagi występujący w mieszaninie krystalicznej substancji leczniczej z bezpostaciową substancją pomocniczą. Bazują one na ocenie

ilościowej rozpuszczania i wzajemnego mieszania składników. Dla mieszanin PAR z HPMC, diagram zawiera dodatkowo krzywą prognozującą przemianę szklistą mieszaniny. Jak dotychczas, w literaturze brak jest informacji na temat zakresu wzajemnej rozpuszczalności i mieszalności paracetamolu w HPMC, pomimo, iż wskazuje ona na duży wpływ substancji pomocniczej na krystaliczność substancji leczniczej.

W wyniku badań DSC, w których PAR oraz jego mieszaniny z HPMC ogrzewano, a następnie chłodzono i powtórnie ogrzewano wykazano, że dodatek HPMC spowodował zahamowanie krystalizacji amorficznej formy PAR.

Stwierdzono korelację pomiędzy przesunięciem krzywej zależności entalpii topnienia substancji czynnej od jej zawartości w mieszaninie z HPMC a mieszalnością składników.

Rozpuszczalność i wzajemna mieszalność substancji czynnych z polimerem wyjaśniają przyczynę niepowodzenia w wykorzystaniu DSC do badań ilościowych substancji czynnych we wzorcowych mieszaninach tabletkowych oraz handlowych preparatach farmaceutycznych. Charakter tych oddziaływań, prowadzących do utraty krystaliczności przez część substancji czynnej, obrazują diagramy fazowe.

BIBLIOGRAFIA

- 1 Farmakopea Polska VII., T. I, Polskie Towarzystwo Farmaceutyczne, Warszawa, 2006
- 2 http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2009/09/WC500002675.pdf (dostęp 13.10.2015)
- 3 http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2011/03/WC500104258.pdf (dostęp 13.10.2015)
- 4 http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2009/09/WC500002651.pdf (dostęp 24.09.2015)
- 5 http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2009/09/WC500003466.pdf (dostęp 09.09.2015)
- 6 http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2009/09/WC500002647.pdf (dostęp 24.09.2015)
- 7 http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2009/09/WC500002649.pdf (dostęp 30.09.2015)
- 8 http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2009/09/WC500002648.pdf (dostęp 29.09.2015)
- 9 http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2015/01/WC500180284.pdf (dostęp 14.10.2015)
- 10 Šašić S., Ozaki Y., Raman, infrared and near-infrared chemical imaging. John Wiley & Sons, Hoboken, 2010, 1-20
- 11 Kealey D., Haines P.J., Sekcja F: Techniki łączone., Sekcja G: Metody termiczne. W: Chemia analityczna. Krótkie wykłady. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa, 2015, 316-318
- 12 Gabbott P., Chapter 1: A practical introduction to differential scanning calorimetry. W: Gabbott P. (Red.) Principles and applications of thermal analysis. Blackwell Publishing, New Delhi, 2008, 2-50
- 13 Laye P.G., Chapter 3: Differential thermal analysis and differential scanning calorimetry. W: Haines P.J. (Red.), Principles of thermal analysis and calorimetry. The Royal Society of Chemistry, Cambridge, 2002, 55-93
- 14 Kealey D., Haines P.J., Sekcja E: Techniki spektrometryczne. W: Chemia analityczna. Krótkie wykłady. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa, 2015, 209-223, 259-276
- 15 Cygański A., Metody spektroskopowe w chemii analitycznej. Wydawnictwo Naukowo-Techniczne, Warszawa, 1993, 225-228
- 16 Parente E., Chapter 5: Description and identification. W: Riley C.M., Rosanske T.W., Riley S.R.R. (Red.), Specification of drug substances and products. Development and validation of analytical methods. Elsevier, Amstredam, 2014, 92-107
- 17 Bloomfielda M., Andrews D., Loeffena P., Tomblinga C., Yorcka T., Matousek P., Non-invasive identification of incoming raw pharmaceutical materials using Spatially Offset Raman Spectroscopy. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2013, 76, 65-69
- 18 Vankeirsbilck T., Vercauteren A., Baeyens W., Van der Weken G., Verpoort F., Vergote G., Remon J.P., Applications of Raman spectroscopy in pharmaceutical analysis. Trends in Analytical Chemistry, 2002, 21, 869-877
- 19 Michalska K., Mizera M., Lewandowska K., Cielecka-Piontek J., Infrared, Raman and ultraviolet with circular dichroism analysis and theoretical calculations of tedizolid. Journal of Molecular Structure, 2016, 1115, 136-143

-
- 20 Soukhova N., Kassymbek Z., Bradby S., Martin-Esker A., White P., Wahab S., Development of characterization methods for entacapone in a pharmaceutical bulk. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2011, 54, 860-865
 - 21 Hulanicki A., Rozdział 14. Techniki sprzężone w chemii analitycznej. W: Hulanicki A. (Red.) *Współczesna chemia analityczna. Wybrane zagadnienia*. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa, 2001, 109-118
 - 22 Clas S.D., Dalton C.R., Hancock B.C., Differential scanning calorimetry: Applications in drug development. *Pharmaceutical Science & Technology Today*, 1999, 2, 311-320
 - 23 McGregor C., Bines E., The use of high-speed differential scanning calorimetry (Hyper-DSCTM) in the study of pharmaceutical polymorphs. *International Journal of Pharmaceutics*, 2008, 350, 48-52
 - 24 Ding M., Xu L., Zhang Y., Zhao Y., Polymorphic characterization and bioavailability of 20(R)-25-methoxyl-dammarane-3 β ,12 β ,20-triol, a novel dammarane triterpenoid saponin, as anticancer agents. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2017, 145, 773-782
 - 25 Pan D., Crull G., Yin S., Grosso J., Low level drug product API form analysis – Avalide tablet NIR quantitative method development and robustness challenges. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2014, 89, 268-275
 - 26 Xie Y., Tao W., Morrison H., Chiu R., Jona J., Fang J., Cauchon N., Quantitative determination of solid-state forms of a pharmaceutical development compound in drug substance and tablets. *International Journal of Pharmaceutics*, 2008, 362, 29-36
 - 27 Sheikhzadeh M., Rohani S., Jutan A., Manifar T., Murthy K., Horne S., Solid-state characterization of buspirone hydrochloride polymorphs. *Pharmaceutical Research*, 2006, 5, 1043-1050
 - 28 Frelek J., Górecki M., Dziedzic A., Jabłońska E., Kamiński B., Wojcieszczyk R.K., Luboradzki R., Szczepek W.J., Comprehensive spectroscopic characterization of finasteride polymorphic forms. Does the form X exist? *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2015, 104, 1650-1657
 - 29 Rollinger J.M., Gstrein E.M., Burger A., Crystal forms of torasemide: New insights. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 2002, 53, 75-86
 - 30 Knopp M.M., Löbmann K., Elder D.P., Rades T., Holm R., Recent advances and potential applications of modulated differential scanning calorimetry (mDSC) in drug development. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2016, 87, 164-173
 - 31 Urbanova M., Sturcova A., Brus J., Bezen H., Skorepova E., Kratochwil B., Cejka J., Sedenkova I., Kobera L., Policianova O., Stur A., Characterizing crystal disorder of trospium chloride: A comprehensive, ¹³C CP/MAS NMR, DSC, FTIR, and XRPD study. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2013, 102, 1235-1248
 - 32 Skotnicki M., Kaźmierska M., Pyda M., Charakterystyka wybranych metod analizy termicznej stosowanych we współczesnej analizie i technologii farmaceutycznej. *Farmacja Polska*, 2012, 68, 124-137
 - 33 Bruni G., Berbenni V., Milanese C., Girella A., Cardini A., Lanfranconi S., Marini A., Determination of the nateglinide polymorphic purity through DSC. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2011, 54, 1196-1199
 - 34 Saklatvala R., Royall P.G., Craig D.Q.M., The detection of amorphous material in a nominally crystalline drug using modulated temperature DSC - A case study. *International Journal of Pharmaceutics*, 1999, 192, 55-62
 - 35 Shi X., Zhong Q., Enhancing lactose crystallization in aqueous solutions by soluble soybean polysaccharide. *Food Research International*, 2014, 66, 432-437
 - 36 Rudrangi S.R.S., Bhomia R., Trivedi V., Vine G.J., Mitchell J.C., Alexander B.D., Wicks S.R., Influence of the preparation method on the physicochemical properties of indomethacin and methyl- β -cyclodextrin complexes. *International Journal of Pharmaceutics*, 2015, 479, 381-390

-
- 37 Rudrangi S.R.S., Trivedi V., Mitchell J.C., Wicks S.R., Alexander B.D., Preparation of olanzapine and methyl- β -cyclodextrin complexes using a single-step, organic solvent-free supercritical fluid process: An approach to enhance the solubility and dissolution properties. *International Journal of Pharmaceutics*, 2015, 494, 408-416
- 38 Onoue S., Uchida A., Nakamura T., Kuriyama K., Hatanaka J., Tanaka T., Miyoshi H., Seto Y., Yamada S., Self-nanoemulsifying particles of coenzyme Q10 with improved nutraceutical potential. *Pharma Nutrition*, 2015, 3, 153-159
- 39 Lefort R., De Gusseme A., Willart J.F., Danède F., Descamps M., Solid state NMR and DSC methods for quantifying the amorphous content in solid dosage forms: An application to ball-milling of trehalose. *International Journal of Pharmaceutics*, 2004, 280, 209-219
- 40 Kiew T.Y., Cheow W.S., Hadinoto K., Preserving the supersaturation generation capability of amorphous drug-polysaccharide nanoparticle complex after freeze drying. *International Journal of Pharmaceutics*, 2015, 484, 115-123
- 41 Yu H., Hadinoto K., Mitigating the adverse effect of spray drying on the supersaturation generation capability of amorphous nanopharmaceutical powders. *Powder Tehnology*, 2015, 277, 97-104
- 42 Cheow W.S., Kiew T.Y., Hadinoto K., Amorphous nanodrugs prepared by complexation with polysaccharides: Carrageenan versus dextran sulfate. *Carbohydrate Polymers*, 2015, 117, 549-558
- 43 Yadav D., Kumar N., Nanonization of curcumin by antisolvent precipitation: Process development, characterization, freeze drying and stability performance. *International Journal of Pharmaceutics*, 2014, 477, 564-577
- 44 Martínez L.M., Videa M., López-Silva G.A., Reyes C.A., Cruz-Angeles J., González N., Stabilization of amorphous paracetamol based systems using traditional and novel strategies. *International Journal of Pharmaceutics*, 2014, 447, 294-305
- 45 Ramos J.J.M., Diogo H.P., The slow relaxation dynamics in active pharmaceutical ingredients studied by DSC and TSDC: Voriconazole, miconazole and itraconazole. *International Journal of Pharmaceutics*, 2016, 501, 39-48
- 46 Kestens V., Zeleny R., Auclair G., Held A., Roebben G., Linsinger T.P.J., Differential scanning calorimetry method for purity determination: A case study on polycyclic aromatic hydrocarbons and chloramphenicol. *Thermochimica Acta*, 2011, 524, 1-6
- 47 Mathkar S., Kumar S., Bystol A., Olawoore K., Min D., Markovich R., Rustum A., The use of differential scanning calorimetry for the purity verification of pharmaceutical reference standards. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2009, 49, 627-631
- 48 Attia A.K., Abdel-Moety M.M., Abdel-Hamid S.G., Thermal analysis study of antihypertensive drug doxazosin mesilate. *Arabian Journal of Chemistry*, 2017,10, S334-S338
- 49 Al-Nahary T.T., El-Ries M.A., Sultan M., Mabkhot Y.N., Al-Hussam A.M., Thermal stability of anti-rheumatic pharmaceutical drugs parecoxib sodium and valdecoxib. *Journal of Saudi Chemical Society*, 2012, 16, 177-182
- 50 Ma K., Wang H., Zhao M., Xing J., Purity determination and uncertainty evaluation of theophylline by mass balans method, high performance liquid chromatography and differential scanning calorimetry. *Analytica Chimica Acta*, 2009, 650, 227-233
- 51 Rundlöf T., Mathiasson M., Bekiroglu S., Hakkarainen B., Bowden T., Arvidsson T., Survey and qualification of internal standards for quantification by ^1H NMR spectroscopy. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2010, 52, 645-651
- 52 Yang D., Wang F., Zhang L., Gong N., Lv Y., Development of a new ferulic acid certified reference material for use in clinical chemistry and pharmaceutical analysis. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, 2015, 5, 231-237

-
- 53 Gong N., Wang X., Zhang B., Gao Z., Du G., Lv Y., Characterization and uncertainty evaluation of a new certified reference material of baicalein. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2014, 89, 106-110
- 54 Nara O., Automatic twin vessel recrystallizer. Effective purification of acetaminophen by successive automatic recrystallization and absolute determination of purity by DSC. *Analytica Chimica Acta*, 2011, 685, 91-102
- 55 Shinde V., Trivedi A., Upadhyay P.R., Gupta N.L., Kanase D.G., Chikate R., Identification of a new impurity in lisinopril. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2007, 43, 381-386
- 56 Vippagunta S.R., Brittain H.G., Grant D.J., Crystalline solids. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2001, 48, 3-26
- 57 Muñoz-Ruiz A., Paronen P., Particle and powder properties of cyclodextrins. *International Journal of Pharmaceutics*, 1997, 148, 33-39
- 58 Pirayavaraporn C., Rades T., Tucker I.G., Determination of moisture content in relation to thermal behaviour and plasticization of Eudragit RLPO. *International Journal of Pharmaceutics*, 2012, 422, 68-74
- 59 Giron D., Thermal analysis and calorimetric methods in the characterisation of polymorphs and solvates. *Thermochimica Acta*, 1995, 248, 1-59
- 60 Arora K.K., Bhardwaj S.P., Mistry P., Suryanarayanan R., Modulating the dehydration conditions of adefovir dipivoxil dihydrate to obtain different physical forms of anhydrate. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2015, 104, 1056-1064
- 61 Salem M.S., Pillai G.K., Nabulsi L., Al-Kaysi H.N., Arafat T.A., Malooh A.A., Saleh M., Badwan A.A., Preparation, characterisation and transformation of terfenadine polymorphic forms. *International Journal of Pharmaceutics*, 1996, 141, 257-259
- 62 Cheng W.T., Lin S.Y., Famotidine polymorphic transformation in the grinding process significantly depends on environmental humidity or water content. *International Journal of Pharmaceutics*, 2008, 357, 164-168
- 63 Verhoeven N., Neoh T.L., Furuta T., Yamamoto C., Ohashi T., Yoshii H., Characteristics of dehydration kinetics of dihydrate trehalose to its anhydrous form in ethanol by DSC. *Food Chemistry*, 2012, 132, 1638-1643
- 64 Tackenberg M.W., Thommes M., Schuchmann H.P., Kleinebudde P., Solid state of processed carbohydrate matrices from maltodextrin and sucrose. *Journal of Food Engineering*, 2014, 129, 30-37
- 65 Royall P.G., Craig D.Q.M., Doherty C., Characterisation of moisture uptake effects on the glass transitional behaviour of an amorphous drug using modulated temperature DSC. *International Journal of Pharmaceutics*, 1999, 192, 39-46
- 66 Grisedale L.C., Belton P.S., Jamieson M.J., Barker S.A., Craig D.Q., An investigation into water interactions with amorphous and milled salbutamol sulphate: The development of predictive models for uptake and recrystallization. *International Journal of Pharmaceutics*, 2012, 422, 220-228
- 67 Islan G.A., Cacicedo M.L., Bosio V.E., Castro G.R., Development and characterization of new enzymatic modified hybrid calcium carbonate microparticles to obtain nano-architected surfaces for enhanced drug loading. *Journal of Colloid and Interface Science*, 2015, 439, 76-87
- 68 Luthra S.A., Shalaev E.Y., Medek A., Hong J., Pikal M.J., Chemical stability of amorphous materials: Specific and general media effects in the role of water in the degradation of freeze-dried zonisamide. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2012, 101, 3110-3123
- 69 Pan X., Liu H., An Z., Wang J., Niu G., Microwave-enhanced dehydration and solvent washing purification of penicillin G sulfoxide. *International Journal of Pharmaceutics*, 2001, 220, 33-41
- 70 Hsu C.H., Lin S.Y., Rapid examination of the kinetic process of intramolecular lactamization of gabapentin using DSC-FTIR. *Thermochimica Acta*, 2009, 486, 5-10

-
- 71 Jamrógiewicz M., Ciesielski A., Application of vibrational spectroscopy, thermal analyses and X-ray diffraction in the rapid evaluation of the stability in solid-state of ranitidine, famotidine and cimetidine. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2015, 107, 236-243
- 72 Lin S.Y., Wang S.L., Advances in simultaneous DSC-FTIR microspectroscopy for rapid solid-state chemical stability studies: Some dipeptide drugs as examples. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2012, 64, 461-478
- 73 Mah P.T., Laaksonen T., Rades T., Peltonen L., Strachan C.J., Differential scanning calorimetry predicts the critical quality attributes of amorphous glibenclamide. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2015, 80, 74-81
- 74 Shamsuzzaman, Khanam H., Mashrai A., Ahmad M., Mabkhot Y.N., Frey W., Siddiqui N., Synthesis, growth, spectral, thermal and crystallographic studies of 5 α ,6 α -epoxycholestane single crystals. *Journal of Crystal Growth*, 2013, 384, 135-143
- 75 Pokharkar V.B., Mandpe L.P., Padamwar M.N., Ambike A.A., Mahadik K.R., Paradkar A., Development, characterization and stabilization of amorphous form of a low Tg drug. *Powder Technology*, 2006, 167, 20-25
- 76 Nazzal S., Wang Y., Characterization of soft gelatin capsules by thermal analysis. *International Journal of Pharmaceutics*, 2001, 230, 35-45
- 77 Tian B., Zhang L., Pan Z., Gou J., Zhang Y., Tang X., A comparison of the effect of temperature and moisture on the solid dispersions: Aging and crystallization. *International Journal of Pharmaceutics*, 2014, 475, 385-392
- 78 Islam M.T., Scoutaris N., Maniruzzaman M., Moradiya H.G., Halsey S.A., Bradley M.S.A., Chowdhry B.Z., Snowden M.J., Douroumis D., Implementation of transmission NIR as a PAT tool for monitoring drug transformation during HME processing. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 2015, 96, 106-116
- 79 Salunkhe N.H., Jadhav N.R., More H.N., Jadhav A.D., Screening of drug-sericin solid dispersions for improved solubility and dissolution. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2018, 107, 1683-1691
- 80 Sansone F., Picerno P., Mencherini T., Villecco F., D'Ursi A.M., Aquino R.P., Lauro M.R., Flavonoid microparticles by spray-drying: Influence of enhancers of the dissolution rate on properties and stability. *Journal of Food Engineering*, 2011, 103, 188-196
- 81 Ambike A.A., Mahadik K.R., Paradkar A., Stability study of amorphous valdecoxib. *International Journal of Pharmaceutics*, 2004, 282, 151-162
- 82 Włodarski K., Sawicki W., Kozyra A., Tajber L., Physical stability of solid dispersions with respect to thermodynamic solubility of tadalafil in PVP-VA. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 2015, 96, 237-246
- 83 Balani P.N., Wonga S.Y., Ng W.K., Widjaja E., Tan R.B.H., Chan S.Y., Influence of polymer content on stabilizing milled amorphous salbutamol sulphate. *International Journal of Pharmaceutics*, 2010, 391, 125-136
- 84 Tran P.H., Tran T.T., Park J.B., Min D.H., Choi H.G., Han H.K., Rhee Y.S., Lee B.J., Investigation of physicochemical factors affecting the stability of a pH-modulated solid dispersion and a tablet during storage. *International Journal of Pharmaceutics*, 2011, 414, 48-55
- 85 Sotthivirat S., McKelvey C., Moser J., Rege B., Xu W., Zhang D., Development of amorphous solid dispersion formulations of a poorly water-soluble drug, MK-0364. *International Journal of Pharmaceutics*, 2013, 452, 73-81
- 86 Armstrong H.E., Galka A., Lin L.S., Lanza T.J. Jr, Jewell J.P., Shah S.K., Guthikonda R., Truong Q., Chang L.L., Quaker G., Colandrea V.J., Tong X., Wang J., Xu S., Fong T.M., Shen C.P., Lao J., Chen J., Shearman L.P., Stribg D.S., Rosko K., Strack A., Ha S., Van der Ploeg L., Goulet M.T.,

-
- Hagmann W.K., Substituted acyclic sulfonamides as human cannabinoid-1 receptor inverse agonists. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 2007, 17, 2184-2187
- 87 Ma Y., Ge S., Wang W., Zheng O., Zuo Y., Zhong C., Sun B., Novel perchlorate and phosphate salts of vinpocetine: Characterization, relative solid-state stability evaluation and Hirshfeld surface analysis. *Journal of Molecular Structure*, 2016, 1105, 1-10
- 88 Bohlooli M., Moosavi-Movahedi A.A., Taghavi F., Maghami P., Saboury A.A., Moosavi-Movahedi Z., Farhadi M., Hong J., Sheibani N., Habibi-Rezaei M., Investigation of thermal reversibility and stability of glycosylated human serum albumin. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2013, 62, 358-364
- 89 Bi M., Hwangb S.J., Morris K.R., Mechanism of eutectic formation upon compaction and its effects on tablet properties. *Thermochimica Acta*, 2003, 404, 213-226
- 90 Klímová K., Leitner J., DSC study and phase diagrams calculation of binary systems of paracetamol. *Thermochimica Acta*, 2012, 550, 59-64
- 91 Sakata Y., Tanabe E., Sumikawa T., Shiraishi S., Tokudome Y., Otsuka M., Effects of solid-state reaction between paracetamol and cloperastine hydrochloride on the pharmaceutical properties of their preparations. *International Journal of Pharmaceutics*, 2007, 335, 12-19
- 92 Marinescu D.C., Pincu E., Oancea P., Meltzer V., Bruni G., Marini A., Meltzer V., Solid-state study of captopril and metoprolol tartrate binary system. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, 2015, 120, 829-837
- 93 Stott P.W., Williams A.C., Barry B.W., Transdermal delivery from eutectic systems: Enhanced permeation of a model drug, ibuprofen. *Journal of Controlled Release*, 1998, 50, 297-308
- 94 Rodante F., Vecchio S., Catalani G., Tomassetti M., Compatibility between active components of a commercial drug. *Il Farmaco*, 2002, 57, 833-843
- 95 Ceschel G.C., Badiello R., Ronchi C., Maffei P., Degradation of components in drug formulations: A comparison between HPLC and DSC methods. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2003, 32, 1067-1072
- 96 Rojek B., Wesołowski M.: Compatibility studies of hydrocortisone with excipients using thermogravimetric analysis supported by multivariate statistical analysis. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, 127, 543-553, 2017
- 97 Verma R.K., Garg S., Compatibility studies between isosorbide mononitrate and selected excipients used in the development of extended release formulations. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2004, 35, 449-458
- 98 da Silveira L.M., Fiorot A.B., Xavier T.P., Yoshida M.I., de Oliveira M.A., Drug-excipient compatibility assessment of solid formulations containing meloxicam. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2018, 112, 146-151
- 99 Rojek B., Suchacz B., Wesołowski M.: Artificial neural networks as a supporting tool for compatibility study based on thermogravimetric data. *Thermochimica Acta*, 659, 222-231, 2018
- 100 Acharya S., Patra S., Pani N.R., Optimization of HPMC and carbopol concentrations in non-effervescent floating tablet through factorial design. *Carbohydrate Polymers*, 2014, 102, 360-368
- 101 Vojinović T., Mederević D., Vranić, Potpara Z., Kristić M., Djuriš J., Ibrić S., Development of ternary solid dispersions with hydrophilic polymer and surface adsorbent for improving dissolution rate of carbamazepine. *Saudi Pharmaceutical Journal*, 2018, 26, 725-732
- 102 Wissing S., Craig D.Q.M., Barker S.A., Moore W.D., An investigation into the use of stepwise isothermal high sensitivity DSC as a means of detecting drug-excipient incompatibility. *International Journal of Pharmaceutics*, 2000, 199, 141-150
- 103 Pawar M.D., Rathna G.V.N., Agrawal S., Kuchekar B.S., Bioactive thermoresponsive polyblend nanofiber formulations for wound healing. *Materials Science and Engineering C*, 2015, 48, 126-137

-
- 104 Katakam P., Padala N.R., Chandu B.R., Elfituri A., Adiki S.K., Kommu R., Design of lamivudine XR matrix tablets: Influence of HPMC and PEO on *in vitro* drug release and bioavailability in rabbits. *Journal of Pharmacy Research*, 2013, 6, 845-852
- 105 Nandi G., Patra P., Priyadarshini R., Kaity S., Ghosh L.K., Synthesis, characterization and evaluation of methacrylamide grafted gellan as sustained release tablet matrix. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2015, 72, 965-974
- 106 Verma R.K., Garg S., Selection of excipients for extended release formulations of glipizide through drug-excipient compatibility testing. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2005, 38, 633-644
- 107 Reginald-Opara J.N., Attamaa A., Ofokansia K., Umeyorb Ch., Kenechukwu F., Molecular interaction between glimepiride and Soluplus1-PEG 4000 hybrid based solid dispersions: Characterisation and anti-diabetic studies. *International Journal of Pharmaceutics*, 2015, 496, 741-750
- 108 Jahangiri A., Barzegar-Jalali M., Garjani A., Javadzadeh Y., Hamishehkar H., Afrozian A., Adibkia K., Pharmacological and histological examination of atorvastatin-PVP K30 solid dispersions. *Powder Technology*, 2015, 286, 538-545
- 109 Meng F., Dave V., Chauhan H., Qualitative and quantitative methods to determine miscibility in amorphous drug-polymer systems. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2015, 77, 106-111
- 110 Marsac P.J., Shamblin S.L., Taylor L.S., Theoretical and practical approaches for prediction of drug-polymer miscibility and solubility. *Pharmaceutical Research*, 2006, 10, 2417-2426
- 111 Guan J., Liu Q., Zhang Y., Chokshi R., Wu H., Mao S., Alginate as potential diphase solid dispersion carrier with enhanced drug dissolution and improved storage stability. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2018, 114, 346-355
- 112 Rumondor A.C.F., Ivanisevic I., Bates S., Alonzo D.E., Taylor L.S., Evaluation of drug-polymer miscibility in amorphous solid dispersion systems. *Pharmaceutical Research*, 2009, 11, 2523-2534
- 113 Papageorgiou G.Z., Papadimitriou S., Karavas E., Georgarakis E., Docoslis A., Bikiaris D., Improvement in chemical and physical stability of fluvastatin drug through hydrogen bonding interactions with different polymer matrices. *Current Drug Delivery*, 2009, 6, 101-112
- 114 Shete A., Murthy S., Korpale S., Yadav A., Sajane S., Sakhare S., Doijad R., Cocrystals of itraconazole with amino acids: Screening, synthesis, solid state characterization, *in vitro* drug release and antifungal activity. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 2015, 28, 46-55
- 115 Sarraguça M.C., Ribeiro P.R.S., Santos A.O., Silva M.C.D., Lopes J.A., A PAT approach for the on-line monitoring of pharmaceutical co-crystals formation with near infrared spectroscopy. *International Journal of Pharmaceutics*, 2014, 471, 478-484
- 116 Janaswamy S., Gill K.L., Campanella O.H., Pinal R., Organized polysaccharide fibers as stable drug carriers. *Carbohydrate Polymers*, 2013, 94, 209-215
- 117 Saganowska P., Wesolowski M.: DSC as a screening tool for rapid co-crystal detection in binary mixtures of benzodiazepines with co-formers. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, 2018, doi.org/10.1007/s10973-017-6858-3
- 118 Cuadra I.A., Cabañasa A., Chedaa J.A.R., Martínez-Casado F.J., Pando C., Pharmaceutical co-crystals of the anti-inflammatory drug diflunisal and nicotinamide obtained using supercritical CO₂ as an antisolvent. *Journal of CO₂ Utilization*, 2016, 13, 29-37
- 119 Saganowska P., Wesolowski M.: Principal component and cluster analyses as supporting tools for co-crystals detection. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, 130, 45-55, 2017
- 120 Yang C., Guo W., Lin Y., Lin Q., Wang J., Wang J., Zeng Y., Experimental and DFT simulation study of novel felodipine cocrystal: characterization, dissolving properties and thermal decomposition kinetics. *Journal of Pharmaceutical and biomedical analysis*, 2018, 154, 198-206

-
- 121 Soares F.L.F., Carneiro R.L., Evaluation of analytical tools and multivariate methods for quantification of co-former crystals in ibuprofen-nicotinamide co-crystals. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2014, 89, 166-175
- 122 Diniz L.F., Souza M.S., Carvalho P.S., da Silva C.C.P., Novel isoniazid cocrystals with aromatic carboxylic acids: crystal engineering, spectroscopy and thermochemical investigations. *Journal of Molecular Structure*, 2018, 1153, 58-68
- 123 Abidi S.S.A., Azim Y., Khan S.N., Khan A.U., Sulfaguanidine cocrystals: synthesis, structural characterization and their antibacterial and haemolytic analysis. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2018, 149, 351-357
- 124 Keng Y., Gu J., Hu X., Synthesis, structure characterization and dissolution of two novel cocrystals of febuxostat. *Journal of Molecular Structure*, 2017, 1130, 480-486
- 125 Dierickx L., Van Snick B., Monteyne T., De Beer T., Remon J.P., Vervaet C., Co-extruded solid solutions as immediate release fixed-dose combinations. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 2014, 88, 502-509
- 126 Ramazani F., Chen W., Van Nostrum C.F., Storm G., Kiessling F., Lammers T., Hennink W.E., Kok R.J., Formulation and characterization of microspheres loaded with imatinib for sustained delivery. *International Journal of Pharmaceutics*, 2015, 482, 123-130
- 127 Ramazani F., Hiemstra C., Steendam R., Kazazi-Hyseni F., Van Nostrum C.F., Storm G., Kiessling F., Lammers T., Hennink W.E., Kok R.J., Sunitinib microspheres based on [PDLLA-PEG-PDLLA]-*b*-PLLA multi-block copolymers for ocular drug delivery. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 2015, 95, 368-377
- 128 Robson H., Craig D.Q.M., Deutsch D., An investigation into the release of cefuroxime axetil from taste-masked stearic acid microspheres. III. The use of DSC and HSDSC as means of characterising the interaction of the microspheres with buffered media. *International Journal of Pharmaceutics*, 2000, 201, 211-219
- 129 Bragagni M., Beneitez C., Martín C., Hernán Pérez de la Ossa D., Mura P.A., Gil-Alegre M.E., Selection of PLA polymers for the development of injectable prilocaine controlled release microparticles: Usefulness of thermal analysis. *International Journal of Pharmaceutics*, 2013, 441, 468-475
- 130 Di Battista C.A., Constenla D., Ramírez-Rigo M.V., Piña J., The use of arabic gum, maltodextrin and surfactants in the microencapsulation of phytosterols by spray drying. *Powder Technology*, 2015, 286, 193-201
- 131 Fonte P., Reis S., Sarmiento B., Facts and evidences on the lyophilization of polymeric nanoparticles for drug delivery. *Journal of Controlled Release*, 2016, 225, 75-86
- 132 Zingel C., Sachse A., Röbling G.L., Müller R.H., Lyophilization and rehydration of iopromide-carrying liposomes. *International Journal of Pharmaceutics*, 1996, 140, 13-24
- 133 Umerska A., Paluch K.J., Santos-Martinez M.J., Medina C., Corrigan O.I., Tajber L., Chondroitin-based nanoplexes as peptide delivery systems – Investigations into the self-assembly process, solid-state and extended release characteristics. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 2015, 93, 242-253
- 134 Jachowicz R., Nürnberg E., Pieszczyk B., Kluczykowska B., Maciejewska A., Solid dispersion of ketoprofen in pellets. *International Journal of Pharmaceutics*, 2000, 206, 13-21
- 135 Nikowitz K., Pintye-Hódi K., Regdon G. Jr, Study of the recrystallization in coated pellets – Effect of coating on API crystallinity. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2013, 48, 563-571
- 136 Simon A., Amaro M.I., Cabral L.M., Healy A.M., de Sousa V.P., Development of a novel dry powder inhalation formulation for the delivery of rivastigmine hydrogen tartrate. *International Journal of Pharmaceutics*, 2016, 501, 124-138

-
- 137 Müller T., Krehl R., Schiewe J., Weiler C., Steckel H., Influence of small amorphous amounts in hydrophilic and hydrophobic APIs on storage stability of dry powder inhalation products. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 2015, 92, 130-138
- 138 Shah B., Khunt D., Bhatt H., Misra M., Padh H., Application of quality by design approach for intranasal delivery of rivastigmine loaded solid lipid nanoparticles: Effect on formulation and characterization parameters. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2015, 78, 54-66
- 139 El-Zahaby S.A., Kassemb A.A., El-Kamel A.H., Formulation and *in vitro* evaluation of size expanding gastro-retentive systems of levofloxacin hemihydrate. *International Journal of Pharmaceutics*, 2014, 464, 10-18
- 140 Macêdo R.O., do Nascimento T.G., Quality control of thiabendazole pre-formulation and tablets by TG and DSC coupled to the photovisual system. *Thermochimica Acta*, 2002, 392-393, 85-92
- 141 Bellur Atici E., Karlığa B., Quantitative determination of two polymorphic forms of imatinib mesylate in a drug substance and tablet formulation by X-ray powder diffraction, differential scanning calorimetry and attenuated total reflectance Fourier transform infrared spectroscopy. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2015, 114, 330-340
- 142 Bucci R., Magri A.D., Magri A.L., DSC in the chemical analysis of drugs. Determination of diclofenac in pharmaceutical formulations. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, 2000, 61, 369-376
- 143 Campanella L., Micieli V., Tomassetti M., Vecchio S., Quantitative determination of acetylsalicylic acid in commercial drugs using DSC: Comparison with titration and UV spectrophotometric methods. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, 2010, 102, 249-259
- 144 Montenegro L., Panico A.M., Bonina F., Quantitative determination of hydrophobic compound entrapment in dipalmitoylphosphatidylcholine liposomes by differential scanning calorimetry. *International Journal of Pharmaceutics*, 1996, 138, 191-197
- 145 Riekens M.K., Pereira R.N., Rauber G.S., Cuffini S.L., de Campos C.E., Silveira M.A., Stulzer H.K., Polymorphism in nimodipine raw materials: Development and validation of a quantitative method through differential scanning calorimetry. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2012, 70, 188-193
- 146 Cygański A., *Chemiczne metody analizy ilościowej*, wyd. 5, Wydawnictwa Naukowo-Techniczne, Warszawa, 1999, 79
- 147 Wolska E., Boniecka M., Sznitowska M., Superdeintegranty – substancje pomocnicze w suplementach diety w postaci tabletek. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*, 2016, 106, 21-34
- 148 Swarbrick J., *Encyclopedia of pharmaceutical technology*, Informa Healthcare, Nowy Jork, 2007, vol. 1, 990
- 149 Dichi E., Sghaier M., Guiblin N., Reinvestigation of the paracetamol-caffeine, aspirin-caffeine, and paracetamol-aspirin phase equilibria diagrams. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, 131, 2018, 2141-2155
- 150 Gombás Á., Szabó-Révész P., Kata M., Regdon Jr. G., Erős I., Quantitative determination of crystallinity of α -lactose monohydrate by DSC. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, 2002, 68, 503-510
- 151 Rowe R.C., Sheskey P.J., Quinn M.E., *Handbook of pharmaceutical excipients*, 6. ed, Pharmaceutical Press and American Pharmacists Association, Grayslake and Washington, 2009, pp. 326-329, 359-361, 685-687, 703-707
- 152 *Farmakopea Polska X*, Urząd Rejestracji Produktów Leczniczych, Wyrobów Medycznych i Produktów Biobójczych, Polskie Towarzystwo Farmaceutyczne, Tom I i II, Warszawa 2014, pp. 1717, 2306, 2822-2823, 3425, 3814

-
- 153 Campanella L., Micieli V., Tomassetti M., Vecchio S., Solid-liquid phase diagrams of binary mixtures. Acetylsalicylic acid(1) + E(2) (E 5 salicylic acid, polyethylene glycol 4000, D-mannitol). *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, 2010, 99, 887-892
- 154 Mazurek-Wądołkowska E., Winnicka K., Czajkowska-Kośnik A., Czyżewska U., Milyk W., Application of differential scanning calorimetry in evaluation of solid state interactions in tablets containing acetaminophen. *Acta Poloniae Pharmaceutica – Drug Research*, 2013, 70, 787-793
- 155 Curtin V., Amharar Y., Gallagher K.H., Corcoran S., Tejber L., Corrigan O.I., Healy A.M., Reducing mechanical activation-induced amorphisation of salbutamol sulphate by co-processing with selected carboxylic acids. *International Journal of Pharmaceutics*, 2013, 456, 508-516
- 156 Byard S.J., Jackson S.L., Smail A., Bauer M., Apperley D., Studies on the crystallinity of a pharmaceutical development drug substance. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2005, 6, 1321-1335
- 157 An G.-W., Zhang H., Cheng X.-L., Zhuo Q.-L., LV Y.C., Electronic structure and hydrogen bond in the crystal of paracetamol drugs. *Structural Chemistry*, 2008, 19, 613-617
- 158 Burgina E.B., Baltakhinov V.P., Boldryeva E.V., Shakhshneider T.P. IR spectra of paracetamol and phenacetin, *Journal of Structural Chemistry*, 2004, 45, 64-73
- 159 Al-Zoubi N., Koundourellis J.E., Malamataris S., FI-IR and Raman spectroscopic methods for identification and quantification of orthorhombic and monoclinic paracetamol in powder mixes. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2002, 29, 459-467
- 160 Łuczak A., Jallo L.J., Dave R.D., Iqbal Z., Polymorph stabilization in processed acetaminophen powders. *Powder Technology*, 2013, 236, 52-62
- 161 Wilson C.C., Hydrogen atoms in acetylsalicylic acid (Aspirin): the librating methyl group and probing the potential well in the hydrogen-bonded dimer. *Chemical Physics Letters*, 2001, 335, 57-63
- 162 Renganayaki V., Srinivasan S., Suriya S., Vibrational spectroscopy investigation on aspirin using semi-empirical calculation. *International Journal of ChemTech Research*, 2012, 4, 983-990
- 163 Tavagnacco L., Schnupf U., Mason P.E., Saboungi M.L., Cesàro A., Brady J.W., Molecular dynamics simulation studies of caffeine aggregation in aqueous solution. *Journal of Physical Chemistry B*, 2011, 115, 10957-10966
- 164 Karthika M., Senthilkumar L., Kanakaraju R., Theoretical studies on hydrogen bonding in caffeine-theophylline complexes. *Computational and Theoretical Chemistry*, 2012, 979, 54-63
- 165 Yao R., Xu J., Lu X., Deng S., Phase transition behaviour of HPMC-AA and preparation of HPMC-PAA nanogels. *Journal of Nanomaterials*, 2011, Article ID 507542
- 166 Boczar M., Wójcik M.J., Szczeponek K., Jamróz D., Zięba A., Kawalek B., Theoretical modeling of infrared spectra of aspirin and its deuterated derivative. *Chemical Physics*, 2013, 286, 63-79.
- 167 Gunasekaran S., Sankari G., Ponnusamy S., Vibrational spectra investigation on xanthine and its derivatives-theophylline, caffeine and theobromine. *Spectrochimica Acta Part A*, 2005, 61, 117-127
- 168 Silva E.M.A., Melo D.M.A., Moura M. F.V., Farias R.F., An investigation about the solid state thermal degradation of acetylsalicylic acid: polymer formation. *Thermochim. Acta*, 2004, 414, 101-104
- 169 Ribeiro Y.A., Caires A.C.F., Boralle N., Ionashiro M., Thermal decomposition of acetylsalicylic acid (aspirin). *Thermochim. Acta*, 1996, 279, 177-181
- 170 Zaini E., Sherry A., Agustin W., Agustin R., Enhancement of dissolution rate of meloxicam by co-grinding technique using hydroxypropyl methylcellulose. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*, 2014, 11, 263-267
- 171 Bhise S.B., Rajkumar M., Effect of HPMC on solubility and dissolution of carbamazepine form III in simulated gastrointestinal fluids. *Asian Journal of Pharmaceutics*, 2008, 2, 38-42

-
- 172 Baghel S., Cathcart H., O'Reilly N.J. Theoretical and experimental investigation of drug-polymer interaction and miscibility and impact on drug supersaturation in aqueous medium. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 2016, 107, 16-31
- 173 Maniruzzaman M., Islam M.T., Moradiya H.G., Halsey S.A., Slipper I.J., Chowdhry B.Z., Snowden M.J., Douroumis D. Prediction of polymorphic transformations of paracetamol in solid dispersions. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2014, 103, 1819-1828
- 174 Djuris J., Nikolakakis I., Ibric S., Djuric Z., Kachrimanis K. Preparation of carbamazepine-Soluplus solid dispersions by hot-melt extrusion, and prediction of drug-polymer miscibility by thermodynamic model fitting. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 2013, 84, 228-237
- 175 Forster A., Hempenstall J., Trucker I., Rades T. Selection of excipients for melt extrusion with two poorly water-soluble drugs by solubility parameter calculation and thermal analysis. *International Journal of Pharmaceutics*, 2001, 226, 147-161
- 176 Chan A., Coppens K., Hall M., He V., Jog P., Larsen P., Koblinski B., Read M., Rothe D., Somasi S., Shrestha U. Solubility parameters as a tool to predict API morphology in hot-melt extruded (HME) formulations containing ethylcellulose, hypromellose and polyethylene oxide. Poster presented at the 2006 Annual Meeting Exposition of the American Association of Pharmaceutical Scientists, 29.10-02.11.2006
- 177 Adhikari K., Flurchick K.M., Valenzano L. Effects of volumetric in molecular crystals: a quantum mechanical investigation on aspirin and paracetamol most stable polymorphs. *Chemical Physics Letters*, 2015, 621, 109-116
- 178 Sibik J., Sargent M.J., Franklin M., Zeitler J.A. Crystallization and phase changes in paracetamol from the amorphous solid to the liquid phase. *Molecular Pharmaceutics*, 2014, 11, 1326-1334
- 179 Hansen C.M., *Hansen Solubility Parameters: A User's Handbook*, wyd. II, CRC Press, Boca Raton, 2007, 349,369
- 180 Li T., Understanding the polymorphism of aspirin with electronic calculations. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2007, 96, 755-760
- 181 Novena L.M., Kumar S.S., Athimoolam S., Saminathan K., Sridhae B., Single crystal, vibrational studies of theophylline (a bronchodilator drug) and its chloride salt. *Journal of Molecular Structure*, 2017, 1133, 294-306
- 182 Barton A.F.M., *Handbook of Solubility Parameters and Other Cohesion Parameters*, wyd. II, CRP Press, Boca Raton, 1991, 356
- 183 Zhao Y., Inbar P., Chokshi H.P., Malick W., Choi D.S., Prediction of the Thermal Phase Diagram of Amorphous Solid Dispersions by Flory–Huggins Theory. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2011, 100, 3196-3207
- 184 Giordano F., Rossi A., Bettini R., Savioli A., Gazzaniga A., Novák Cs. Thermal behavior of paracetamol polymeric excipients mixtures. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, 2002, 68, 575-590

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 hypromelozą 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 hypromelozą, 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 między-cząsteczkowe 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 hypromelożą 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 criterions 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.