# Gdański Uniwersytet Medyczny Wydział Farmaceutyczny z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej

**Piotr Szynkaruk** 

# Analiza termiczna wybranych metyloksantyn i soli magnezu stosowanych w lecznictwie

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

> Promotor pracy: prof. dr hab. Marek Wesołowski

> > Gdańsk, 2019

Pragnę złożyć serdeczne podziękowania Promotorowi, Panu prof. dr hab. Markowi Wesołowskiemu, bez którego moja praca doktorska nie mogłaby powstać.

Dziękuję za poświęcony czas, inspirację do badań, merytoryczne ukierunkowanie, wsparcie i ogromną życzliwość, kreatywne podejście w poszukiwaniu rozwiązań problemów analitycznych, cenne wskazówki, za całą przekazaną mi przez te lata wiedzę, niezliczone godziny konsultacji, za nieocenioną pomoc udzieloną w trakcie przygotowywania pracy doktorskiej, cierpliwość i wyrozumiałość oraz motywację do krytycznego spojrzenia na problematykę badawczą.

Szczególne podziękowania pragnę złożyć Panu Profesorowi za pomoc w jasnym formułowaniu myśli naukowej oraz inspirację do zgłębiania zagadnień naukowych.

# Spis treści

Skróty i symbole stosowane w pracy	4
I. Część teoretyczna	6
1. Wprowadzenie	6
2. Metody analizy termicznej	7
2.1. Różnicowa kalorymetria skaningowa	10
2.2. Różnicowa analiza termiczna	12
2.3. Termograwimetria	13
3. Techniki łączone w analizie termicznej	14
4. Analiza termiczna w farmacji	16
4.1. Polimorfizm	17
4.2. Wykrywanie niezgodności	23
4.3. Analiza czystości	28
4.4. Inne przykłady zastosowań	29
5. Pozostałe metody analizy termicznej	32
II. Cel pracy	39
III. Część doświadczalna	40
1. Materiały	40
2. Metody	42
3. Obliczenia	43
IV. Wyniki doświadczeń i dyskusja	45
1. Metyloksantyny	45
2. Związki magnezu	54
3. Produkty zawierające metyloksantyny	64
3.1. Identyfikacja składu produktów farmaceutycznych	65
3.2. Spektroskopia w podczerwieni	70
3.2.1. Analiza widm FT-IR metyloksantyn	70
3.2.2. Analiza widm Ramana metyloksantyn	73
4. Produkty zawierające związki magnezu	74
4.1. Identyfikacja składników badanych produktów	75
4.2. Analiza FT-IR produktów ze związkami magnezu	79
4.3. Widma Ramana produktów ze związkami magnezu	82
V. Wnioski	85
VI. Piśmiennictwo	87
Streszczenie	97
Abstract	100
Wykaz osiągnięć w pracy naukowo-badawczej	103
Oryginalne publikacje	106

# Skróty stosowane w pracy

Skrót	Nazwa w języku angielskim	Nazwa w języku polskim
ANN	Artificial neural networks	Sztuczne sieci neuronowe
BCS	Biopharmaceutics classification system	System klasyfikacji biofarmaceutycznej
СА	Custer analysis	Analiza skupień
CP-MAS NMR	Cross-polarization magic angle spinning NMR	NMR z polaryzacją skośną pod kątem magicznym
DDTA	Derivative DTA	Różniczkowa DTA
DEA	Dielectric analysis	Analiza dielektryczna
DETA	Dielectric thermal analysis	Termiczna analiza dielektryczna
DLS	Dynamic light scattering	Dynamiczne rozpraszanie światła
DMA	Dynamic mechanical analysis	Dynamiczna analiza mechaniczna
DSC	Differential scanning calorimetry	Różnicowa kalorymetria skaningowa
DTA	Differential thermal analysis	Różnicowa analiza termiczna
DTD	Derivative TD	Różniczkowa TD
DTG	Differential TG	Różniczkowa TG
DTMA	Dynamic thermomechanical analysis	Dynamiczna analiza termomechaniczna
EGA	Evolved gas analysis	Analiza produktów gazowych
EGD	Evolved gas detection	Detekcja produktów gazowych
EPR	Electron paramagnetic resonance	Elektronowy rezonans paramagnetyczny
ETA	Emanation thermal analysis	Termiczna analiza emanacyjna
FA	Factor analysis	Analiza faktorowa
Fast DSC	Fast-scan DSC	Szybka DSC
FT-IR	Fourier-transform IR	Spektroskopia IR z transformacją Fouriera
FT-Raman	Fourier-transform Raman	Spektroskpia Ramana z transformacją Fouriera
GC	Gas chromatography	Chromatografia gazowa
HPDSC	High-pressure DSC	Wysokociśnieniowa DSC
HPLC	High-performance liquid chromatography	Wysokosprawna chromatografia cieczowa
HSDSC	High-sensitivity DSC	DSC o wysokiej czułości
HSM	Hot-stage microscopy	Termomikroskopia
Hyper DSC	High-performance DSC	Super szybka DSC
ICTA	International Confederation for Thermal Analysis	Międzynarodowa Konfederacja Analizy Termicznej
ICTAC	International Confederation for Thermal Analysis and Calorimetry	Międzynarodowa Konfederacja Analizy Termicznej i Kalorymetrii
IMC	Isothermal microcalorimetry	Mikrokalorymetria izotermiczna
IR	Infrared spectroscopy	Spektroskopia w podczerwieni
IST	Isothermal stress testing	Test izotermicznego stresu

IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry	Międzynarodowa Unia Chemii Czystej i Stosowanej
LC	Liquid chromatography	Chromatografia cieczowa
MS	Mass spectrometry	Spektrometria mas
NIR	Near infrared spectroscopy	Spektroskopia w bliskiej podczerwieni
NMR	Nuclear magnetic resonance spectroscopy	Spektroskopia magnetycznego rezonansu jądrowego
PCA	Principal component analysis	Analiza głównych składowych
PLM	Polarized light microscopy	Mikroskopia optyczna w świetle spolaryzowanym
PLTM	Polarized light thermal microscopy	Termomikroskopia optyczna w świetle spolaryzowanym
PPSL	Pulsed photostimulated luminescence	Fotolumiescencja stymulowana impulsami światła
PTKAT	Polish Society of Calorimetry and Thermal Analysis	Polskie Towarzystwo Kalorymetrii i Analizy Termicznej
Raman	Raman spectroscopy	Spektroskopia Ramana
SEM	Scanning electron microscopy	Skaningowa mikroskopia elektronowa
ss-NMR	Solid-state NMR	NMR ciała stałego
ТА	Thermoacoustimetry	Termoakustometria
TBA	Torsional braid analysis	Analiza wyboczenia skrętnego
TD	Thermodilatometry	Termodylatometria
TDX	Thermodiffractometry	Termodyfraktometria
TG	Thermogravimetry	Termograwimetria
TL	Thermoluminescence	Termoluminescencja
ТМ	Thermomagnetometry	Termomagnetometria
TMA	Thermomechanical analysis	Analiza termomechaniczna
TMDSC	Temperature modulated DSC	DSC z modulowaną temperaturą
TR-XRPD	Temperature-resolved XRPD	Temperaturowo-rozdzielcza XRPD
TS	Thermosonimetry	Termosonimetria
TSDC	Thermally stimulated depolarization current	Prąd termicznie stymulowanej depolaryzacji
UV-Vis	Ultraviolet-visible spectroscopy	Spektroskopia w zakresie widzialnym i ultrafiolecie
X-EDS	X-ray energy dispersive spectroscopy	Spektroskopia dyspersji promieniowania rentgenowskiego
XRPD	X-ray powder diffraction	Proszkowa dyfraktometria rentgenowska
XRSCD	X-ray single crystal diffraction	Dyfraktometria rentgenowska pojedynczego kryształu

# I. Część teoretyczna

#### 1. Wprowadzenie

Chemia analityczna w nowoczesnym ujęciu jest nauką stosowaną, zajmującą się odkrywaniem i formułowaniem praw, kryteriów i metod umożliwiających ustalenie z określoną czułością, precyzją i niepewnością składu obiektów materialnych [Kocjan, 2015; Szczepaniak, 2012; McMahon, 2007; Skoog et al., 2007]. Z tej definicji wynika podwójny charakter chemii analitycznej, praktyczny, polegający na ustalaniu składu obiektów materialnych i podstawowy, sprowadzający się do opracowania nowych metod analitycznych i ich oceny. Nieustanny rozwój wiedzy zwiększa możliwości chemii analitycznej, zarówno jeżeli chodzi o obszary jej zastosowania, jak i o wiarygodność pomiaru. Połączenie wiedzy z zakresu chemii, fizyki, biologii, matematyki, a także informatyki umożliwiło powstanie i zastosowanie różnych technik analitycznych do określania składu jakościowego i ilościowego prawie wszystkich obiektów materialnych.

Dynamicznie rozwijający się obszar chemii analitycznej stanowi analiza termiczna [Gabbott, 2008; Haines, 2002; Höhne et al., 1996; Hatakeyama & Zhenhai, 1998]. Obejmują one dość dużą grupę technik, z których najczęściej stosowana jest różnicowa kalorymetria skaningowa (*Differential Scanning Calorimetry*, DSC), różnicowa analiza termiczna (*Differential Thermal Analysis*, DTA) i termograwimetria (*Thermogravimetry*, TG). Ważną zaletą tych metod jest to, że umożliwiają analizę substancji w fazie stałej. Jest to niezmiernie istotne z punktu widzenia analizy i technologii farmaceutycznej, gdyż pozwala na otrzymanie szeregu informacji o substancji bez konieczności jej rozpuszczenia. Daje również możliwość oceny substancji w jej naturalnej postaci, a więc identycznej do tej, w której jest przechowywana czy też aplikowana pacjentowi. Z kolei brak konieczności przeprowadzania próbki do roztworu często przyspiesza analizę.

Początki analizy termicznej datują się od momentu odkrycia i rozpoczęcia użytkowania ognia [Haines, 2002]. Człowiek, nie rozumiejąc jeszcze procesów zachodzących w różnych substancjach i materiałach podczas ogrzewania, obserwował je, a później także rejestrował. Pierwsze wzmianki odnoszące się do analizy termicznej pochodzą z XVIII w. W tym okresie rozpoczęła się era industrializacji. Zwiększająca się liczba ludności spowodowała wzrost zapotrzebowania na wszelkiego rodzaju dobra konsumpcyjne. Aby sprostać temu zadaniu niezbędne było podniesienie wydajności produkcji w wielu segmentach gospodarki. W związku z wprowadzeniem gospodarki opartej na mechanizacji produkcji, zmianie musiała ulec kontrola

jakości materiałów używanych do produkcji, jak i finalnych produktów. Aby sprostać potrzebom przemysłu, naukowcy rozpoczęli wielokierunkowe prace w różnych obszarach badawczych, co zaowocowało dużą liczbą odkryć i umożliwiło rozwój wielu dziedzin nauki. Ponieważ w procesach produkcyjnych temperatura odgrywa znaczącą rolę, a substancje pod jej wpływem ulegają różnym modyfikacjom, rozpoczął się rozwój metod opartych na pomiarze zmian właściwości fizykochemiczncyh substancji w funkcji temperatury.

Dopiero jednak na początku XX w., w związku z odkryciem wielu praw chemicznych i fizycznych stanowiących podstawę nowoczesnej nauki, nastąpił dynamiczny rozwój metod analizy termicznej, który trwa do dnia dzisiejszego. Rys historyczny rozwoju metod termicznych ilustruje Tabela 1. Z poniższego opracowania wynika, że metody analizy termicznej znajdują coraz szersze zastosowanie już od ponad 40–50 lat.

1				
Lp.	Rok	Wydarzenie		
1.	1887	Le Chatelier wykorzystał krzywe termiczne do identyfikacji gliny		
2.	1899	Roberts-Austen wprowadził różnicową metodę temperaturową		
3.	1903	termin analiza termiczna po raz pierwszy został użyty przez Tammann		
4.	1904	Śurnakov opracował uniwersalny rejestrator fotograficzny, który został wykorzystany w óżnicowej analizie termicznej (DTA)		
5.	1915	Honda zdefiniował podstawy nowoczesnej termograwimetrii, wprowadzając termowagę		
6.	1919	utworzono Międzynarodową Unię Chemii Czystej i Stosowanej (IUPAC)		
7.	1945	wyprodukowano pierwszy komercyjny termograwimetr		
8.	1960	zaprezentowano szerokie opracowania na temat różnicowej analizy termicznej		
9.	1964	wprowadzenie różnicowej kalorymetrii skaningowej przez Watsona		
10.	1965	I Międzynarodowa Konferencja na temat Analizy Termicznej – Aberdeen, Szkocja		
11.	1968	II Międzynarodowa Konferencja Analizy Termicznej – Boston, USA; Międzynarodowa Konfederacja Analizy Termicznej (ICTA) zmieniła nazwę na Międzynarodową Konfederację Termicznej Analizy i Kalorymetrii (ICTAC)		
12.	1969	wydano pierwszy numer Journal of Thermal Analysis		
13.	1970	wydano pierwszy numer Thermochimica Acta		
14.	1985	utworzono Polskie Towarzystwo Kalorymetrii i Analizy Termicznej (PTKAT)		

Tabela 1 Krótka historia analizy termicznej [Hatakeyama & Zhenhai, 1998].

### 2. Metody analizy termicznej

Analiza termiczna jest jedną z wielu powszechnie stosowanych metod analitycznych do badania substancji leczniczych, pomocniczych i produktów farmaceutycznych [Stodghill, 2010; Lukas & LeMaire, 2009; Saunders, 2008; Sichina, 2001; Clas et al., 1999; Wesołowski, 1992a; Wesołowski, 1992b; Wesołowski, 1985]. Aktualnie przyjęta definicja analizy termicznej zaproponowana przez Międzynarodową Konfederację Analizy Termicznej i Kalorymetrii (*International Confederation for Thermal Analysis and Calorimetry*, ICTAC) podaje, że analiza termiczna stanowi grupę technik, w których fizyczne właściwości substancji i/lub produktów reakcji są mierzone w funkcji temperatury, podczas gdy substancja poddawana jest kontrolowanemu programowi temperatury [Lever et al., 2014]. Z definicji tej wynika, że pomiary wykonywane technikami analizy termicznej spełniają trzy podstawowe kryteria [Hatakeyama & Zhenhai, 1998], tj.:

- a) musi być mierzona właściwość fizyczna,
- b) pomiar musi być wyrażony bezpośrednio lub pośrednio w funkcji temperatury,
- c) pomiar musi być dokonany w warunkach kontrolowanej zmiany temperatury.

W zależności od sposobu ogrzewania próbki w czasie pomiaru, metody analizy termicznej dzieli się na statyczne i dynamiczne [Stoch, 1998]. W trakcie termicznej analizy statycznej (pomiary izotermiczne), temperatura próbki zmieniana jest skokowo i utrzymywana jest na danym poziomie aż do osiągnięcia przez próbkę stanu równowagi termodynamicznej, swoistej dla danej temperatury. Metodami statycznymi bada się najczęściej dysocjację termiczną mierząc zmianę masy próbki lub przemiany fazowe (np. krystalizację), obserwując zmianę składu fazowego próbki. Metody te umożliwiają wyznaczenie temperatury równowagi badanych procesów. Analiza termiczna dynamiczna wykonywana jest przy stopniowym, zwykle liniowym wzroście lub obniżaniu temperatury (pomiary nie-izotermiczne). Obecnie stosuje się niemal wyłącznie metody dynamiczne, gdyż umożliwiają szybkie wykonanie analizy badanej próbki.

Analiza termiczna obejmuje cały szereg metod, ponieważ przedmiotem pomiaru może być wiele różnych właściwości fizycznych substancji [Lever et al., 2014]. Obecnie trzy metody analizy termicznej odgrywają największą rolę, tj. DSC, DTA i TG [Gabbott, 2008; Haines, 2002]. Nie należy jednak zapominać o pozostałych metodach, których rola systematycznie wzrasta. Najlepiej poznane metody termiczne zestawiono w Tabeli 2. Umożliwiają one pomiary w bardzo szerokim zakresie temperatur, od temperatur skrajnie niskich (–150°C) do skrajnie wysokich (1600°C). Zakres temperatur, w którym można stosować metody analizy termicznej zestawiono w Tabeli 3.

Wyniki pomiarów metodami analizy termicznej przedstawia się w postaci krzywych termoanalitycznych, tzn. krzywych obrazujących zależność mierzonej właściwości fizycznej od temperatury [Lever et al., 2014; Gabbott, 2008; Haines, 2002]. Rejestrując krzywe zapisuje się temperaturę lub czas na osi odciętych, a zmianę wybranej właściwości fizycznej, np. entalpii, na osi rzędnych, wskazując czy zmiana jest endotermiczna czy egzotermiczna. Niekiedy rejestruje się również ich pierwsze pochodne, a uzyskane krzywe różniczkowe określają szybkość zmian mierzonego parametru, ułatwiając odróżnienie nakładających się na siebie efektów termicznych

i dokładne wyznaczenie temperatur przemian fazowych lub rozkładu termicznego. Najczęściej rejestruje się różniczkowe krzywe TG (*Differential TG*, DTG), DTA (*Derivative DTA*, DDTA) i dylatometryczne (*Derivative thermodilatometry*, DTD).

Lp.	Metoda	Mierzony parametr	Symbol
1.	Różnicowa analiza termiczna	różnica temperatur	DTA
2.	Różnicowa kalorymetria skaningowa (typ przepływu ciepła)	swobodny przepływ strumienia ciepła	DSC
3.	Różnicowa kalorymetria skaningowa (typ kompensacji ciepła)	kompensowany przepływ strumienia ciepła	DSC
4.	Termograwimetria	Termograwimetria zmiana masy	
5.	Detekcja produktów gazowych	objętość wydzielającego się składnika gazowego	EGA
6.	Analiza składu produktów gazowych	analiza składu chemicznego wydzielanych gazów	EGD
7.	Termiczna analiza emanacyjna	oznaczanie wydzielających się radioaktywnych składników gazowych	ETA
8.	Termodyfraktometria	dyfrakcja promieni X	TDX
9.	Termoelektrometria	przepływ prądu elektrycznego	
10.	Dielektryczna analiza termiczna	polaryzacja elektryczna	DEA
11.	Termomagnetometria	magnetyzacja	
12.	Termodylatometria	zmiana wymiarów	TD
13.	Analiza termomechaniczna	deformacja pod wpływem obciążeń	TMA
14.	Dynamiczna analiza mechaniczna	moduł tłumienia drgań wywołanych oscylacyjnym obciążeniem	DTMA
15.	Termoakustymetria	przepływ fal akustycznych	ТА
16.	Termosonimetria	natężenie efektów dźwiękowych	TS
17.	Termorefraktometria	współczynnik załamania światła	
18.	Termoluminescencja	luminescencja	TL
19.	Termospektroskopia	pomiar widma światła przechodzącego lub odbitego	
20.	Termomikroskopia	obraz mikroskopowy	

Tabela 2 Metody	analizy termiczne	ej [Stoch,	1998].
-----------------	-------------------	------------	--------

Metody analizy termicznej umożliwiają analizę dużej grupy substancji oraz są źródłem cennych informacji analitycznych przy zastosowaniu specjalistycznej aparatury. Współczesne przyrządy do analizy termicznej stwarzają duże możliwości w zakresie łączenia ze sobą różnych technik analizy termicznej, jak również prowadzenia pomiarów równocześnie z udziałem innych technik instrumentalnych [Haines, 2002; Stoch, 1998]. Aktualnie, w analizie termicznej stosowane są trzy sposoby łączenia technik pomiarowych – techniki jednoczesne, jednoczesne techniki sprzężone i techniki jednoczesne współdziałające nieciągle [Stoch, 1998], które wykorzystuje się m.in. do analizy składu fazowego i chemicznego substancji, do określania ich czystości i trwałości, a w badaniach fizykochemicznych do wyznaczania

parametrów termodynamicznych i kinetycznych reakcji. Zagadnienie to omówiono szerzej w rozdziale 3 – Techniki łączone w analizie termicznej.

Lp.	Metoda	Zakres temperatur, °C
1.	TG (praca w wysokiej temperaturze)	od 20 do 1600
2.	TG-DTA (pomiar w warunkach standardowych)od 20 do 1000	
3.	3. DTA (praca w wysokiej temperaturze) od 20 do 16	
4.	4.Typ przepływu strumienia ciepła DSC (standardowy)od 150 do 750	
5.	Typ przepływu strumienia ciepła DSC (bardzo czuły)	od –100 do 100
6.	ТМА	od 150 do 700
7.	DMA	od -150 do 500
8.	Aparatura do pomiarów wiskoelastyków	od -150 do 500

Tabela 3 Zakres pomiarowy standardowych analizatorów termicznych dostępnych komercyjnie [Hatakeyama & Zhenhai, 1998].

# 2.1. Różnicowa kalorymetria skaningowa

Różnicowa kalorymetria skaningowa (*Differential Scanning Calorimetry*, DSC) stanowi metodę, w której rejestruje się energię konieczną do sprowadzenia do zera różnicy temperatur między próbką i substancją odniesienia. Obie substancje ogrzewa się lub chłodzi w sposób kontrolowany, a krzywa DSC odzwierciedla ilość ciepła wymienionego przez próbkę z otoczeniem w jednostce czasu w funkcji czasu (t) lub temperatury (T): dH/dt = f(t) = f(T)[Gabbott, 2008; Haines, 2002]. Różnicowe kalorymetry skaningowe mogą pracować w zakresie temperatur od –170°C do 750°C. Osiągnięcie wyższych temperatur jest trudne technicznie ze względów materiałowych. Ponadto, zwiększają się wtedy błędy wywołane stratami ciepła przez promieniowanie, w związku z czym tzw. stała kalorymetryczna zmienia swą wartość ze wzrostem temperatury.

W kalorymetrach różnicowych typu *heat flux* dokonuje się pomiaru energii cieplnej przepływającej pomiędzy badaną substancją a blokiem grzejnym [Gabbott, 2008]. Służą do tego połączone różnicowo baterie termoelementów (termopar), umieszczone pod pojemnikami na substancję badaną i odniesienia. Ten rodzaj DSC pozwala na pomiar w wysokich temperaturach, jednak wraz ze wzrostem temperatury rośnie błąd pomiaru. Jedną z przyczyn jest trudna do kontrolowania strata ciepła w wyniku promieniowania.

Zaletą kalorymetrów DSC typu *heat flux* jest możliwość szybkiego wyznaczania entalpii przemiany fazowej i zmian ciepła molowego wraz ze zmianą temperatury. Metoda ta pozwala rejestrować przemiany fazowe, którym towarzyszą słabe efekty cieplne, takie jak przemiany szkliste, polimorficzne, krystalizacja i inne. DSC typu *heat flux* znalazła szczególnie szerokie zastosowanie w badaniu polimerów. Jest ona też stosowana w przemyśle do kontroli przebiegu

procesów technologicznych. Do tych celów opracowano systemy DSC z automatycznym podawaniem próbek (autosampler).

Drugi rodzaj przyrządów do DSC to kalorymetr różnicowy z kompensacją mocy, tzw. power compensation DSC [Gabbott, 2008]. W metodzie tej próbka badana i substancja odniesienia znajdują się w identycznych, termicznie izolowanych piecach, które są niezależnie sterowane w ten sposób, aby temperatura obu substancji utrzymywała się na stałym poziomie. Piece te wyposażone są w dodatkowe elementy grzewcze służące do wyrównywania ich temperatur. Różnica temperatur powstaje wówczas, gdy badana próbka pochłania lub wydziela więcej ciepła niż substancja odniesienia. Sygnałem mierzonym jest moc dostarczana do elementów grzejnych pieców zużyta do utrzymywania zerowej różnicy temperatur między substancją odniesienia i próbką badaną. Z krzywych DSC można bezpośrednio wyznaczyć ciepło reakcji oraz ciepło molowe substancji w funkcji temperatury.

W zależności od sposobu konstrukcji przyrządów do DSC, zasad ich działania i specyfiki pomiaru, wyróżnia się wiele wersji technik DSC [Kowalska, 2017; Stodghill, 2010; Gabbott, 2008; Haines, 2002; Hatakeyama & Zhenhai, 1998]. Jedną z odmian jest DSC z modulowaną temperaturą (*Temperature modulated DSC*, TMDSC) [Kowalska, 2017; Knopp et al., 2016; Danley, 2003; Carpentier et al., 2002; Pielichowski & Flejtuch, 2002; Hill et al., 1999; Verdonck et al., 1999; Hatakeyama & Zhenhai, 1998; Coleman & Craig, 1996]. W tej metodzie program liniowego ogrzewania lub chłodzenia próbki został zmodyfikowany poprzez nałożenie na liniową zmianę temperatury, temperatury modulowanej w czasie, o charakterze okresowym, np. sinusoidalnym. Pomiary za pomocą TMDSC umożliwiają separację procesów odwracalnych (termodynamicznych, np. przemian szklistych), od procesów nieodwracalnych (kinetycznych, np. przemian fazowych takich jak topnienie lub krystalizacja). Duża użyteczność TMDSC wynika również z możliwości bezpośredniego pomiaru ciepła właściwego w całym zakresie temperatur. TMDSC jest przydatna podczas rozdzielania nakładających się na siebie pików, do badania kinetyki przemian fazowych lub reakcji chemicznych oraz do badania subtelnych przemian trudnych do wykrycia przy użyciu konwencjonalnej DSC.

Kolejną użyteczną techniką jest ciśnieniowa kalorymetria skaningowa (*High-pressure DSC*, HPDSC), przydatną szczególnie do badania hydratów substancji farmaceutycznych [Han et al., 1998; Han & Suryanarayanan, 1997]. Pomiary DSC w warunkach podwyższonego ciśnieniu ułatwiają separację dwóch nakładających się pików endotermicznych związanych z dehydratacją i parowaniem, ponieważ temperatura wrzenia wody zależy od ciśnienia, podczas gdy temperatura dehydratacji nie zależy. Ponadto, HPDSC eliminuje dwie główne niedogodności związane z pomiarami DSC, tj. brak możliwości kontroli ciśnienia wewnątrz

naczynka pomiarowego oraz nagły wzrost ciśnienia spowodowany przemianą ciecz-gaz zachodzącą powyżej temperatury wrzenia wody.

W badaniu substancji do celów farmaceutycznych stosowana jest również szybka DSC (*Fast-scan DSC*, Fast DSC) [Ford & Mann, 2012; Gaisford & Buanz, 2011; Gabbott, 2008] i super szybka DSC (*High-performance DSC*, Hyper DSC) [Gabbott, 2008]. W obu technikach badane próbki ogrzewa się z dużą szybkością wzrostu temperatury; w pierwszym przypadku stosuje się szybkość ogrzewania rzędu 200±50°C/min, podczas gdy w drugim – w granicach 300–750°C/min [Kowalska, 2017]. W związku z tym, poprzez odpowiedni dobór szybkości ogrzewania można oddzielić procesy kinetyczne od termodynamicznych, a duża szybkość ogrzewania skraca znacznie czas trwania eksperymentów. Duża czułość pomiarów ułatwia rejestrację i interpretację efektów cieplnych związanych z przemianami polimorficznymi lub przemianami szklistymi (faza amorficzna).

Na uwagę zasługuje także DSC o wysokiej czułości (*High-sensitivity DSC*, HSDSC), określana również mianem "mikrokalorymetri" [Gaisford & Buckton, 2001]. Umożliwia ona rejestrację efektów cieplnych w skali  $\mu$ W, z czułością ±0,5  $\mu$ W, dzięki zastosowaniu większej masy próbki i użyciu stosunkowo małej szybkości ogrzewania, do 2°C/min. Zwiększenie, zarówno czułości metody jak i wielkości próbki w porównaniu z konwencjonalną DSC, rozszerza jej zastosowanie w farmacji, które obejmuje m.in. badanie procesów denaturacji białek, przemian fazowych lipidów, fizycznej i chemicznej trwałości substancji czynnych, zgodności/niezgodności między substancjami leczniczymi i pomocniczymi, a także badanie interakcji między biomakrocząsteczkami (polimerami, lipidami, kwasami nukleinowymi).

#### 2.2. Różnicowa analiza termiczna

Różnicowa analiza termiczna (*Differential Thermal Analysis*, DTA) jest metodą polegającą na rejestracji różnicy temperatur między substancją badaną i substancją odniesienia względem czasu lub temperatury [Haines, 2002]. Obie substancje znajdują się w identycznych warunkach pomiarowych i są ogrzewane lub chłodzone w sposób kontrolowany. Efektem pomiaru jest krzywa różnicowej analizy termicznej (krzywa DTA). Na krzywej tej różnica temperatur ( $\Delta$ T) odkładana jest na osi rzędnych, a na osi odciętych temperatura lub czas, o wartościach wzrastających od lewej strony ku prawej.

Krzywa DTA wskazuje różnicę temperatur (ΔT) [Szczepaniak, 2012]. Pik skierowany ku górze (dodatni) oznacza, że w układzie zachodzi reakcja egzotermiczna, a pik skierowany ku dołowi (ujemny) wskazuje na reakcję endotermiczną. W bloku grzewczym są umieszczone dwa

tygle; w jednym znajduje się substancja badana, a w drugim substancja odniesienia, która nie ulega przemianom termicznym w badanym zakresie temperatur.

Odmianą różnicowej analizy termicznej jest wysokociśnieniowa DTA. W tej technice pojemnikami na próbki są bomby ciśnieniowe lub autoklawy o zminiaturyzowanych wymiarach [Stoch, 1998]. Urządzenia tego typu umożliwiają wykonanie analizy DTA przy ciśnieniach dochodzących do 10<sup>5</sup> kPa i temperaturze do 900°C. W badaniach specjalnych znajduje również zastosowanie podwójna analiza różnicowa. W metodzie tej próbka i substancja odniesienia to te same substancje pod względem chemicznym, ale różnią się tym, że substancja odniesienia jest wzorcem analitycznym o wysokim stopniu czystości. W tej sytuacji w próbce i substancji odniesienia zachodzą te same procesy fizykochemiczne, w tym samym zakresie temperatur. Identyczne efekty termiczne w obu substancjach kompensują się wzajemnie, a na krzywej DTA uwidaczniają się piki wskazujące, np. na obecność zanieczyszczeń, którymi mogą być produkty degradacji, lub na różnice w składzie fazowym i chemicznym obu substancji. Podwójna analiza różnicowa znalazła zastosowanie do badania różnic między próbkami tego samego rodzaju, wynikających m.in. z różnego uporządkowania struktury krystalicznej.

Metoda polegająca na wyznaczeniu pierwszej pochodnej krzywej DTA  $d(\Delta T)/dt = f(t)$ nosi nazwę różniczkowej różnicowej analizy termicznej (*Derivative DTA*, DDTA) [Stoch, 1998; Wesołowski & Teodorczyk, 1987]. Przedstawia ona zmianę szybkości reakcji w zależności od czasu lub temperatury. Maksima na krzywej różniczkowej określają sytuacje, w których szybkość obniżania się temperatury wskutek postępu reakcji lub szybkość wzrostu temperatury po wyczerpaniu się reagującego składnika są największe. W temperaturze piku  $T_p$  $(T_p -$  wysokość piku) krzywa przecina linię podstawową.

#### 2.3. Termograwimetria

Zasada pomiaru w termograwimetrii (*Thermogravimetry*, TG) polega na rejestrowaniu zmian masy, jej ubytku względnie przyrostu ( $\Delta$ m), zachodzących w wyniku ogrzewania próbki w warunkach liniowego wzrostu temperatury [Gabbott, 2008; Haines, 2002]. Wykreśla się te zmiany w funkcji czasu (t) lub temperatury (T) otrzymując krzywą TG:  $\Delta m = \int (t) = \int (T)$ , bądź też rejestruje się szybkość zmiany masy (dm/dt) w funkcji czasu lub temperatury uzyskując różniczkową krzywą termograwimetryczną (*Differential TG*, DTG). Krzywa DTG posiada znaczną przewagę nad krzywą TG, ponieważ każda zmiana w szybkości zmiany masy próbki jest bardziej widoczna na krzywej DTG niż TG. Umożliwia ona rozdzielenie nakładających się etapów rozkładu. Nieznaczny występ na pliku DTG może wskazywać na obecność dwóch prawie całkowicie pokrywających się procesów termicznych, natomiast wydłużony koniec

piku, tzw. ogonowanie piku, może wskazywać na silną adsorpcją gazowych produktów rozkładu na powierzchni nowo tworzonej fazy.

Kształt krzywych TG i DTG zależy m.in. od warunków pomiaru [Hatakeyama & Zhenhai, 1998]. Krzywe TG odzwierciedlające reakcje dysocjacji termicznej, otrzymane metodą statyczną, mają strome stopnie ubytku masy, podczas gdy krzywe tej samej substancji badanej w warunkach dynamicznych charakteryzują się stopniami szeroko rozciągniętymi. Pojawiają się one ponadto w temperaturze wyższej niż te uzyskane w trakcie pomiaru wykonanego w warunkach statycznych. Na kształt krzywych TG i DTG wpływa też transport ciepła z otoczenia do reagującej substancji i transport produktów gazowych w kierunku przeciwnym. Mała szybkość rozkładu badanej próbki powodowana jest zwykle powolnym dopływem ciepła wskutek małego przewodnictwa cieplnego próbki. Z kolei utrudnione odprowadzanie gazowych produktów rozkładu wywołuje lokalny wzrost ich prężności w porach próbki i powoduje wzrost temperatury rozkładu. Szybkość odprowadzania produktów gazowych zależy z kolei od warunków pomiaru: kształtu pojemnika na próbkę, grubości warstwy próbki, stopnia jej ubicia, składu atmosfery pieca, itp.

Istotnymi elementami układu pomiarowego są również tygle, których kształt i materiał, z którego są wykonane dobiera się w zależności od tego jaka substancja będzie analizowana [Hatakeyama & Zhenhai, 1998]. Kształt i materiał pojemnika może również wywierać wpływ na krzywą TG. Od tygli wymaga się, aby materiał z którego zostały wykonane nie wchodził w reakcje z badaną substancją. Najczęściej używane są tygle z aluminium, porcelany, platyny i kwarcu. Pojemniki ceramiczne wchodzą niekiedy w reakcje z badaną substancją, a pojemniki platynowe mogą katalizować rozkład lub utlenianie próbki. W termograwimetrii stosowane są pojemniki na próbki o różnym kształcie. Oprócz tradycyjnych, cylindrycznych tygli używane są też pojemniki talerzowe, pozwalające rozkładać próbkę cienką warstwą na dużej powierzchni. Dla ułatwienia wymiany gazowych produktów rozkładu z otoczeniem, stosuje się również pojemniki wykonane z siatki platynowej. Pozwalają one na uzyskanie bardziej stromych stopni ubytku masy na krzywej TG.

# 3. Techniki łączone w analizie termicznej

Współczesna aparatura do analizy termicznej stwarza szerokie możliwości w zakresie łączonego stosowania metod, nie tylko w obszarze różnych technik analizy termicznej, ale także łączenia technik analizy termicznej z innymi technikami instrumentalnymi [Haines, 2002; Giron, 2002; Stoch, 1998; Giron, 1995]. Aktualnie wyróżnia się trzy grupy połączonych technik

pomiarowych, które definiuje się jako techniki jednoczesne, jednoczesne techniki sprzężone i techniki jednoczesne współdziałające nieciągle [Stoch, 1998].

Terminem "techniki jednoczesne" określa się badanie danej próbki w tym samym czasie dwoma lub większą liczbę technik pomiarowych, np. równocześnie wykonywane pomiary DTA i TG lub DSC i TG. Pierwszym przyrządem umożliwiających jednoczesne pomiary DTA, TG i DTG był derywatograf skonstruowany przez braci Paulików i wprowadzony na rynek w 1955 r. [Haines, 2002]. Jednoczesne pomiary DTA i TG służą do wykrywania reakcji związanych ze zmianą masy, np. rozkładu, utleniania i redukcji oraz do wyznaczania parametrów ich kinetyki [Stoch, 1998]. Znalazły też zastosowanie do określania ilości substancji ulegającej rozkładowi na podstawie wielkości ubytku masy, towarzyszącego charakterystycznej dla badanej substancji reakcji. Innym przykładem może być prowadzenie jednoczesnych pomiarów przy użyciu DSC i mikrospektroskopii w podczerwieni z transformacją Fouriera (*Fourier-transform infrared*, FT-IR) [Lin & Wang, 2012].

Pojęcie "jednoczesne techniki sprzężone" obejmuje badanie tej samej próbki za pomocą dwóch lub więcej technik instrumentalnych działających niezależnie, przy czym aparaty te połączone są łącznikami. Przykładem takich badań może być sprzężenie TG ze spektrometrią mas (*Mass Spectrometry*, MS) (TG-MS) [Éhen et al., 2005] lub z chromatografią gazową (*Gas chromatography*, GC) sprzężoną z MS (TG-GC-MS) [Procópio et al., 2011].

Kolejną, nowoczesną techniką łączoną jest sprzężenie technik TG, DTA i MS (TG-DTA-MS [Hatakeyama & Zhenhai, 1998]. Jest to wysoce czuła platforma analityczna umożliwiająca identyfikacje nieznanych związków. Jonizacja za pomocą strumienia elektronów powoduje utworzenie charakterystycznego jonu molekularnego i jego dalszą fragmentację. Widmo mas, przedstawiające rozdział jonów według wartości stosunku masa/ładunek, jest unikalne dla każdego związku. Spektrometria mas z kwadrupolowym analizatorem jonów jest najczęściej używaną techniką do analizy gazowych produktów rozkładu (*Evolved gas analysis*, EGA). Składniki wydzielonego gazu wykrywane są w stanie gazowym. Widmo mas, lub jego wybrane obszary, mogą być rejestrowane podczas procesu rozkładu nawet dla próbek o masie rzędu nanogramów. Istotnym problemem w sprzężeniu spektrometru mas z aparaturą do analizy termicznej jest bardzo duża różnica ciśnień między komorami pomiarowymi urządzeń. Znane są również przykłady sprzężenia DSC z IR lub DSC/DTA albo TG z detektorem wydzielonego gazu (*Evolved Gas Detection*, EGD) i/lub analizatorem wydzielonego gazu (EGA).

Pod pojęciem "techniki jednoczesne współdziałające nieciągle" kryje się badanie próbki za pomocą dwóch lub więcej sprzężonych technik pomiarowych, gdy pobieranie substancji do badań dla drugiej z tych technik lub sam pomiar odbywają się w sposób nieciągły [Stoch, 1998]. Przykładem są techniki – DTA i GC, gdy do analizy chromatograficznej pobiera się odpowiednie porcje lotnych produktów reakcji wydzielających się z badanej próbki, umieszczonej w aparaturze do DTA.

#### 4. Analiza termiczna w farmacji

Metody analizy termicznej, szczególnie DSC i DTA stosowane alternatywnie oraz TG, są nowoczesnymi, zautomatyzowanymi i skomputeryzowanymi technikami instrumentalnymi, które umożliwiają badanie w szerokim zakresie temperatur i w atmosferze różnych gazów, przemian fizycznych i reakcji chemicznych, jakim ulegają substancje stosowane do celów farmaceutycznych (substancje czynne, substancje pomocnicze), mieszaniny tych substancji, półprodukty oraz gotowe produkty farmaceutyczne [Stodghill, 2010; Lukas & LeMaire, 2009; Saunders, 2008; Giron et al., 2007; Craig & Reading, 2007; Giron et al., 2004; Giron, 2002; Sichina, 2001; Clas et al., 1999; Giron, 1995; Barnes et al., 1993; Wesołowski, 1992a; Wesołowski, 1992b; Giron, 1990; Ford & Timmins, 1989; Wesołowski, 1985].

Najważniejsze procesy, jakie z punktu widzenia technologii farmaceutycznej mogą być badane tymi technikami, to przemiany fazowe – topnienie, krystalizacja i rekrystalizacja, parowanie, sublimacja, polimorfizm i pseudo-polimorfizm, przemiana szklista, hydratacja, dehydratacja i rehydratacja, solwatacja i desolwatacja, reakcje chemiczne z udziałem fazy stałej, ciekłej i gazowej oraz degradacja substancji i jej rozkład termiczny [Saunders, 2008; Wesołowski, 1985]. Poza obserwacjami jakościowymi uzyskanymi na podstawie krzywych termoanalitycznych, użycie profesjonalnego oprogramowania komputerowego umożliwia uzyskanie danych ilościowych w postaci charakterystycznych temperatur opisujących przemiany fazowe, wartości entalpii przemian i ciepła właściwego badanej substancji oraz wyznaczenie parametrów kinetycznych, tj. wartości energii aktywacji, współczynnika przedeksponencjalnego i rzędu reakcji rozkładu.

Rozpatrując użyteczność metod analizy termicznej w laboratoriach pracujących na rzecz przemysłu farmaceutycznego można stwierdzić, że są one powszechnie stosowane w rutynowej kontroli surowców farmaceutycznych, w tym ich czystości i w badaniu polimorfizmu [Giron, 2002; Giron, 1995]. Jak wynika z danych przedstawionych w Tabeli 4, techniki analizy termicznej są coraz częściej stosowane we wstępnym etapie formowania stałych postaci leku (preformulacja) i przyczyniają się wydatnie do opracowania trwałej i skutecznej w działaniu postaci leku. Są one szczególnie użyteczne podczas konstrukcji diagramów fazowych i identyfikacji eutektyków, w badaniu procesów związanych z rozproszeniem substancji czynnej w obojętnym nośniku, w szybkim wykrywaniu interakcji, tj. niezgodności do wzajemnego mieszania się substancji leczniczych z pomocniczymi oraz w badaniu trwałości termicznej i kinetyki rozkładu substancji stosowanych w technologii stałych postaci leku. Najważniejsze przykłady zastosowania analizy termicznej w farmacji przedstawiono poniżej.

Lp.	Zastosowanie w farmacji	Metody termoanalityczne i techniki łączone	
1	Polimorfizm		
	Surowce farmaceutyczne: charakterystyka form polimorficznych, badanie wpływu procesów krystalizacji, suszenia lub mielenia na formy polimorficzne	DSC, DTA, TG DSC-IR, DSC-XRPD HSM	
1.	Surowce farmaceutyczne: wpływ warunków przechowywania	DSC, DTA, TG	
	Preparaty farmaceutyczne: kontrola procesów mieszania substancji, granulowania, rozdrabniania, ugniatania, suszenia rozpyłowego, topnienia, liofilizacji na formę polimorficzną	DSC, DTA, TG DSC-IR, DSC-FT-IR	
	Stan bezpostaciowy		
	Pomiar temperatury przemiany szklistej, wpływ na wartość przemiany szklistej wilgoci i substancji pomocniczych	DSC, TMDSC	
2.	Badanie polimerów i kopolimerów	DSC, TMDSC	
	Optymalizacja technologii wytwarzania preparatów farmaceutycznych: mikrosfery, liofilizacja, powlekanie	DSC, TMDSC	
	Ocena ilościowa	DSC, mikrokalorymetria	
	Czystość		
3.	Surowce farmaceutyczne: ocena czystości i procesu oczyszczania, ocena trwałości	DSC	
	Trwałość termiczna		
4.	Rozkład termiczny, kinetyka rozkładu	DSC, DTA, TG, TG-MS, TG-IR	
	Zdolność do jednorodnego mieszania się składników	mikrokalorymetria	
	Preparaty farmaceutyczne		
	Oddziaływania fizyczne, przemiany fazowe	DSC	
5.	Optymalizacja procesów tworzenia: stałych rozproszeń, roztworów stałych, mikrosfer, postaci leku o zmodyfikowanym uwalnianiu substancji, liofilizatów	DSC, DSC-IR	
	Topnienie miękkich postaci leku	DSC	
	Identyfikacja, analiza ilościowa	DSC	

Tabela 4 Wybrane przykłady zastosowań metod analizy termicznej w badaniach nad lekiem [Giron, 1995].

# 4.1. Polimorfizm

Polimorfizm to zjawisko występowania substancji w stanie stałym w różnych formach krystalicznych, o tym samym składzie chemicznym, a odmiennych właściwościach fizycznych oraz niektórych właściwościach chemicznych [Sykuła et al., 2006; Wesołowski, 2000; Giron, 1995]. Zjawisko polimorfizmu odnosi się wyłącznie do materii w stałym stanie skupienia. Istnienie polimorfów, czyli form krystalicznych, jest wynikiem różnego rodzaju "upakowania" atomów w sieci krystalicznej, z osiągnięciem jak najmniejszej entalpii topnienia w danych

warunkach ciśnienia i temperatury [Sykuła et al., 2006]. Istnienie form polimorficznych oznacza, że poszczególne odmiany różnią się nieznacznie temperaturami topnienia [Bauer et al., 2001]. Najlepiej poznanym przykładem polimorfizmu jest węgiel, który może występować w postaci grafitu, diamentu, fulerenów, nanorurek oraz grafenu [Kawasumi et al., 2013; Wesołowski, 2000; Giron, 1995].

Zdecydowana większość ciał stałych występuje w przyrodzie nieożywionej w postaci krystalicznej. Istnieją jednak również substancje, które nie są krystaliczne; tego rodzaju ciała nazywa się bezpostaciowymi (amorficznymi) [Sienko & Plane, 1996]. Łączą one w sobie cechy ciała stałego, np. niezmienność kształtu i objętości, z właściwościami cieczy, czyli brakiem uporządkowania. Substancje amorficzne podczas ogrzewania nie topią się w wąskim zakresie temperatur, ale miękną stopniowo w pewnym zakresie temperatur i przechodzą w sposób ciągły od stanu, w którym wykazują cechy zbliżone do właściwości ciała stałego, do stanu w którym można je uważać za przechłodzoną ciecz o znacznej lepkości. Różnice między substancjami krystalicznymi i amorficznymi występują wyłącznie w fazie stałej, w roztworze wykazują te same właściwości fizykochemiczne.

Bezpostaciowe ciała stałe to również substancje lecznicze, w tym przypadku można stwierdzić, iż odmiana bezpostaciowa jest zwykle lepiej rozpuszczalna niż odmiana krystaliczna, w związku z tym wchłania się łatwiej w organizmie wykazując większą skuteczność terapeutyczną [Szeleszczuk et al., 2019]. Dlatego substancje lecznicze poddaje się często mikronizacji, jednak nie zawsze proces ten wpływa w zadowalającym stopniu na zwiększenie szybkości rozpuszczania substancji czynnej.

Innym, bardzo często występującym w przyrodzie zjawiskiem jest izomorfizm, inaczej równopostaciowość. Polega on na strukturalnym podobieństwie dwóch lub większej liczby substancji [Bielański, 2012]. Substancjami izomorficznymi są więc związki różniące się wzorem chemicznym, ale tworzące ten sam typ sieci przestrzennej, wykazujące takie same lub bardzo zbliżone wymiary komórek elementarnych i posiadające podobne właściwości chemiczne. Ich cechą charakterystyczną jest zdolność do tworzenia roztworów stałych, czyli kryształów mieszanych. Izomeryczne są np. kalcyt (CaCO<sub>3</sub>), syderyt (FeCO<sub>3</sub>) i magnezyt (MgCO<sub>3</sub>).

Zainteresowanie polimorfizmem wzrosło, gdy zaobserwowano to zjawisko wśród substancji leczniczych. Powszechnie znany jest fakt wycofania z obrotu w końcu lat 90' ubiegłego wieku leku przeciwwirusowego – ritonawiru (Norvir®), jak również w latach 2010–2011, dwuskładnikowego preparatu obniżającego ciśnienie krwi, zawierającego irbesartan (Avalide®), z powodu pojawienia się w zawierających je produktach farmaceutycznych trudno

rozpuszczalnych form polimorficznych tych substancji [Lee et al., 2011; Bauer et al., 2001]. Przykłady badania polimorfizmu substancji leczniczych zestawiono w Tabeli 5.

Do badania przemian krystalicznych w substancjach leczniczych stosowane są różne techniki instrumentalne. Podstawową metodą umożliwiającą wykrycie i identyfikację form polimorficznych jest analiza termiczna [Saifee et al., 2009; Giron, 2001; Giron, 1998; Giron, 1995]. W piśmiennictwie można znaleźć wiele przykładów wykorzystania metod analizy termicznej, takich jak DSC, TMDSC, DTA, TG, DTG, EGD, EGA, termodylatometria (*Thermodilatometry*, TD) i analiza termomechaniczna (*Thermomechanical analysis*, TMA) w badaniu polimorfizmu. Są one najczęściej wspomagane rentgenowską analizą dyfrakcyjną, proszkową (*X-ray powder diffraction*, XRPD) i pojedynczego kryształu (*X-ray single crystal diffraction*, XRSCD), a ponadto termomikroskopią (*Hot-stage microscopy*, HSM). Stosuje się też różne techniki spektroskopii z zakresu podczerwieni (*Infrared spectroscopy*, IR) oraz spektroskopię magnetycznego rezonansu jądrowego (*Nuclear magnetic resonance spectroscopy*, NMR). Większość tych metod umożliwia określenie zmian w strukturze krystalicznej badanej substancji w funkcji temperatury.

Duża użyteczność metod analizy termicznej w wyznaczaniu charakterystycznych temperatur i entalpii przemian polimorficznych wynika z faktu, że umożliwiają one pomiar wielkości ciepła wymienionego przez próbkę z otoczeniem, co odzwierciedlają efekty endo- i egzotermiczne (wysokie, ostro zakończone, o stosunkowo dużej powierzchni i przebiegające w wąskim zakresie temperatur). Są one względnie łatwe do interpretacji, ponieważ występują w zakresie temperatur, w którym zwykle badana substancja nie ulega ani degradacji, ani rozkładowi termicznemu.

Jedną z najważniejszych konsekwencji występowania polimorfizmu jest jego wpływ na biodostępność substancji czynnych, co znajduje swoje odzwierciedlenie w Systemie Klasyfikacji Biofarmaceutycznej (*Biopharmaceutics Classification System*, BCS) [Sykuła et al., 2006]. Jeżeli substancja czynna posiada kilka odmian polimorficznych, to transformacja formy termodynamicznie nietrwałej w drugą przebiega bardzo wolno. Taka forma jest bardzo pożądana, w przeciwieństwie do szybko tworzącej się trwałej odmiany polimorficznej. Zazwyczaj najtrwalsza forma posiada najwyższą temperaturę topnienia i najniższą rozpuszczalność w stosunku do pozostałych postaci oraz najmniejszą entalpię topnienia [Wesołowski, 2000]. Przemiana nietrwałej formy polimorficznej badanej substancji w jej trwałą postać stała się podstawowym problemem w charakterystyce biodostępności danego leku.

Lp.	Substancje lecznicze	Formy polimorficzne, hydraty i solwaty, postać amorficzna	Zastosowane metody badań	Piśmiennictwo
1.	Aripiprazol	forma polimorficzna III; monohydrat; przemiany polimorficzne w tabletkach	DSC, TG, FT-Raman, TR-XRPD	Łaszcz & Witkowska, 2016
2.	Artemizynina	dwie enancjotropowe formy polimorficzne	DSC, XRPD, TR-XRPD	Horosanskaia et al., 2014
3.	Atowakwon	dwie formy polimorficzne	DSC, TG, XRPD, TR-XRPD, XRSCD	Malpezzi et al., 2010
4.	Benzokaina, butamben, izobutamben	dwie formy polimorficzne	DSC, TG, FT-IR, FT-Raman, HSM, XRPD	Schmidt, 2005
5.	Betaksolol	dwie formy polimorficzne	DSC, IR, PLTM, XRPD, MAS <sup>1</sup> H NMR	Maria et al., 2013
6.	Chlorowodorek olopatydyny	dwie monotropowe formy polimorficzne; polimorfizm konformacyjny izomeru Z	DSC, IR, Raman, XRPD, XRSCD	Łaszcz et al., 2016
7.	Chlorowodorek pramokainy, pramokaina	trzy formy polimorficzne dwie formy polimorficzne	DSC, FT-IR, FT-Raman, HSM, XRPD	Schmidt et al., 2003
8.	Chlorowodorek wenlafaksyny	dwie formy polimorficzne; analiza ilościowa techniką XRPD	DSC, Raman, SEM, ss-NMR, XRPD	Bernardi et al., 2013
9.	Dipirydamol	dwie formy polimorficzne	DSC, FT-IR, TG, XRPD	Berbenni et al., 2002
10.	Famotydyna	dwie formy polimorficzne	DSC, XRPD, FT-IR, FT-Raman	Nemet et al., 2005
11.	Flukonazol	forma krystaliczna; forma bezpostaciowa	DSC, FT-IR, XRPD	Desai et al., 2003
12.	Fumaran kwetiapiny	dwie formy polimorficzne; forma amorficzna; wpływ różnych czynników stresowych	DSC, XRPD	Nayak & Patra, 2012
13.	Glibenklamid	nowa forma krystaliczna	DSC, FT-IR, HSM, SEM, XRPD	Panagopoulou-Kaplani & Malamataris, 2000
14.	Indometacyna	solwat z tetrahydrofuranem	DSC, TG, XRPD	Nicolai et al., 2010

# Tabela 5 Wybrane przykłady badania polimorfizmu substancji leczniczych z użyciem metod analizy termicznej.

15.	Kandydat na substancję leczniczą, numer kodu API-CG3	dwie enancjotropowe formy polimorficzne	DSC, TG, FT-IR, HSM, XRPD	Pfeffer-Henning et al., 2004
16.	Kandydat na substancję leczniczą, numer kodu GW597599B	dwie formy polimorficzne	DSC, TMDSC, TG, SEM, XRPD	Bruni et al., 2010
17.	Karbamazepina	dwie formy polimorficzne; ogrzewanie z szybkością 250°C/min	DSC, Fast-DSC, XRPD	McGregor et al., 2004
18.	Karbamazepina	cztery formy polimorficzne; dihydrat	DSC, SEM, XRPD	Gosselin et al., 2003
19.	Karbamazepina	trzy formy polimorficzne	DSC, FT-IR, HSM-FT-IR, XRPD	Rustuichelli et al., 2000
20.	Karbamazepina	nowa forma polimorficzna	DSC, HSM-FT-IR	Hilfiker et al., 2003
21.	Karisoprodol	trzy formy polimorficzne; nowa metatrwała forma B	DSC, HSM, XRPD, TSDC	Diogo et al., 2018
22.	Kwas chenodeoksycholowy	dwie formy polimorficzne; forma bezpostaciowa	DSC, XRPD, TR-XRPD, FT-IR	Oguchi et al., 2003
23.	Laurynian salbutamolu	dwie formy polimorficzne	DSC, TG, IR, HSM, SEM, XRPD	Caira et al., 2002
24.	Mesylan amlodypiny	forma krystaliczna; monohydrat; bezwodna forma izomorficzna	DSC, TG, FT-IR, FT-Raman, XRPD	Rollinger & Burger, 2002
25.	Mesylan doksazosyny	siedem form polimorficznych; forma bezpostaciowa	DSC, TG, FT-IR, HSM, SEM, XRPD, TR-XRPD	Greman et al., 2002
26.	Mesylan imatynibu	dwie formy polimorficzne; forma bezpostaciowa	DSC, XRPD, XRSCD, UV-Vis	Grillo et al., 2012
27.	Nifedypina	cztery formy polimorficzne	DSC, TMDSC, TG, HSM, HPLC	Keymolen et al., 2003
28.	Nikotynamid	cztery formy polimorficzne	DSC, TG, HSM, HPLC	Hino et al., 2001
29.	Olanzapina	dwie formy polimorficzne; solwat z mieszaniną woda-dimetylosulfotlenek	DSC, TG, Raman, XRPD, XRSCD	Polla et al., 2005
30.	Piroksykam	trzy formy polimorficzne; nowa forma polimorficzna III; monohydrat	DSC, TG, FT-IR, FT-Raman, CP-MAS <sup>13</sup> C NMR	Vrecer et al., 2003

31.	Piroksykam	trzy formy polimorficzne; wpływ stresu termicznego i mechanicznego; kinetyka przemian fazowych	DSC, TG, Raman, SEM, HPLC, XRPD, TR-XRPD	Kogermann et al., 2011
32.	Pochodne organicznych związków siarki i selenu jako potencjalne substancje lecznicze	niektóre z badanych związków tworzą formy polimorficzne	DSC, HSM, XRPD	Plano et al., 2011
33.	Roksytromycyna, octan deksametazonu	solwaty z acetonitrylem; monohydrat; solwat z dimetylosulfotlenkiem; półtorahydrat	DSC, SEM, XRPD, TR-XRPD, <sup>1</sup> H-NMR	Mallet et al., 2003
34.	Seknidazol	dwie monotropowe formy polimorficzne; półhydrat	DSC, TG, XRPD, FT-IR, Raman, HSM	Bezerra et al., 2016
35.	Sulindak	solwaty form polimorficznych z różnymi rozpuszczalnikami	DSC, TG, Raman, SEM, HSM, X-EDS	Cavallari et al., 2016
36.	Terfenadyna	cztery formy polimorficzne	DSC, XRPD	Leitao et al., 2002

Skróty metod analitycznych: CP-MAS NMR – NMR z polaryzacją skośną pod kątem magicznym; DSC – różnicowa kalorymetria skanningowa; FT-IR – spektroskopia IR z transformacją Fouriera; FT-Raman – spektroskopia Ramana z transformacją Fouriera; HPLC – wysokosprawna chromatografia cieczowa; HSM – termomikroskopia; Fast-DSC – szybka DSC; IR – spektroskopia w poczerwieni; NMR – spektroskopia magnetycznego rezonansu jądrowego; PLTM – termomikroskopia optyczna w świetle spolaryzowanym; Raman – spektroskopia Ramana; SEM – skaningowa mikroskopia elektronowa; ss-NMR – NMR ciała stałego; TG – termograwimetria; TMDSC – DSC z modulowaną temperaturą; TSDC – prąd termicznie stymulowanej depolaryzacji; TR-XRPD – temperaturowo-rozdzielcza XRPD; UV-Vis – spektroskopia w zakresie widzialnym i ultrafiolecie; X-EDS – spektroskopia dyspersji energii promieniowania rentgenowskiego; XRPD – proszkowa dyfraktometria rentgenowska; XRSCD – dyfraktometria rentgenowska pojedynczego kryształu.

Szybkość wchłaniania substancji czynnej z podanego doustnie produktu zależy od szybkości jej rozpuszczania. Poszczególne odmiany polimorficzne różnią się szybkością rozpuszczania i mogą wykazywać różną biodostępność. W związku z tym, w przypadku substancji leczniczej o małej rozpuszczalności, a zatem i małej szybkości wchłaniania, nie zostanie osiągnięte odpowiednie stężenie terapeutyczne.

W praktyce farmaceutycznej przyjęto zasadę, że jako substancję czynną wybiera się zazwyczaj tę postać, która jest termodynamicznie trwała w temperaturze pokojowej. Dzięki temu uzyskuje się pewność, że w gotowej postaci leku nie nastąpi przemiana jednej formy polimorficznej w drugą.

Znanych jest wiele substancji czynnych, które mogą występować w różnych formach krystalicznych [Sykuła et al., 2006; Wesołowski, 2000; Giron, 1995]. Podczas krystalizacji polimorficznej ustala się stan równowagi, prowadzący zwykle do utworzenia tylko jednej formy polimorficznej. Wpływ na tworzącą się odmianę polimorficzną ma rodzaj rozpuszczalnika, szybkość krystalizacji, obecność innych substancji, mieszanie, a także stężenie roztworu. Zmiana jednego z tych czynników może doprowadzić do transformacji odmiany polimorficznej. Transformacja jednej formy w drugą może przebiegać z różną szybkością także podczas różnych procesów technologicznych, np. podczas suszenia, przechowywania substancji, a także podczas mielenia, granulowania czy tabletkowania. Problemy związane z przemianą jednej formy krystalicznej w drugą mają szczególne znaczenie w przypadku produktów z dużymi dawkami substancji czynnej. Z tego względu należy zidentyfikować i zbadać właściwości fizykochemiczne wszystkich form krystalicznych już we wczesnym etapie badań substancji czynnej oraz w etapie preformulacji.

# 4.2. Wykrywanie niezgodności

Istotnym zagadnieniem w technologii farmaceutycznej jest wykrywanie niezgodności między składnikami produktów farmaceutycznych, czyli określenie wzajemnej tolerancji składników w mieszaninach [Narang et al., 2012; Nishath et al., 2011; Ahmad et al., 2010]. Przykłady badania niezgodności zestawiono w Tabeli 6. Zwykle leki podawane chorym zawierają poza substancją czynną także substancje pomocnicze. Brak zdolności do jednorodnego mieszania się składników wynika z oddziaływań między nimi. W wyniku tych oddziaływań następują zmiany właściwości fizycznych i chemicznych lub terapeutycznych postaci leku. Niezgodności chemiczne są wynikiem reakcji zobojętniania, hydrolizy, utleniania-redukcji lub reakcji kompleksowania. Natomiast interakcje fizyczne uwidaczniają się w m.in.

postaci zmiany krystaliczności substancji czynnej, rozpuszczalności i szybkości rozpuszczania, lub tworzenia eutektyku albo roztworu stałego.

Jak dotąd, w literaturze nie opisano uniwersalnego sposobu postępowania przy badaniu niezgodności, a liczba metod pomocnych przy ich wykrywaniu jest ograniczona, m.in. ze względu na konieczność prowadzenia badań w fazie stałej [Chadha & Bhandari, 2014]. Wśród metod najczęściej polecanych do tego typu badań znajdują się techniki analizy termicznej, tj. DSC, DTA, TG i DTG, techniki spektroskopowe z zakresu IR, NMR i NMR ciała stałego (*Solid-state NMR*, ss-NMR), a ponadto XRPD, XRSCD i temperaturowo-rozdzielcza XRPD (*Temperature-resolved XRPD*, TR-XRPD) [Roumeli et al., 2013; Lavor et al., 2012; Nep & Conway, 2012; Pani et al., 2012; Duda-Seiman et al., 2011; Bharate et al., 2010; Adeyeye & Brittain, 2008]. Zaletą tych technik jest to, że zapewniają szybką analizę próbek w stanie stałym, o stosunkowo małej masie (od kilku do kilkunastu mg), bez konieczności ich specjalnego przygotowania do badań.

Zaawansowane techniki DSC – HSDSC [McDaid et al., 2003], izotermiczna mikrokalorymetria (*Isothermal microcalorimetry*, IMC) [Terada et al., 2006; Schmitt et al., 2001] oraz analiza termiczna w skali mikro [Harding et al., 2008; Royall et al., 1999], również zostały użyte do badania niezgodności między składnikami produktów farmaceutycznych. Odznaczają się jednak pewnymi ograniczeniami, do których należy wysoka cena aparatury oraz jej małe rozpowszechnienie w laboratoriach przemysłu farmaceutycznego.

Stosując metody analizy termicznej można wykryć niezgodności fizyczne i chemiczne [Narang et al., 2012; Nishath et al., 2011; Ahmad et al., 2010]. Dane literaturowe wskazują, że spośród metodą analizy termicznej, DSC jest najczęściej wykorzystywaną techniką w badaniu niezgodności. Wynika to z faktu, iż w przypadku DSC interakcje między substancją leczniczą i substancjami pomocniczymi można łatwo wykryć na podstawie analizy kształtu krzywej DSC. Badania polegają na rejestrowaniu krzywych DSC substancji leczniczych, pomocniczych i ich mieszanin fizycznych, a następnie na ich porównaniu. Wystąpienie niezgodności identyfikuje się na podstawie braku endo- lub egzotermicznego piku DSC, pojawienia się nowego piku, zmiany jego kształtu, przesunięcia temperatury początku piku lub temperatury piku oraz na podstawie zmiany stosunku wysokości piku do jego szerokości w połowie wysokości [Narsai et al., 1997]. Wskazują one, czy składniki mieszanin reagują ze sobą w wyższych temperaturach, czy zachodzą przemiany fazowe. Pojawienie się nowych efektów może być wywołane obecnością nowo utworzonych połączeń.

	Tabela 6 Wybrane przykłady badania zgodności/niezgodności między składnikami produktów farmaceutycznych z użyciem metod analizy termicznej.			
Lp.	Substancje lecznicze	Substancje pomocnicze	Metody badania	Piśmiennictwo

Lp.	Substaneje reezineze	Substancje pomocnieze	Wietou y badailla	1 Isiniciliitetwo
1.	Acetaminofen	kwas cytrynowy, poliwinylopirolidon, aspartam, mannitol, celuloza, skrobia, stearynian magnezu	DSC, TG, XRPD	Tomassetti et al., 2005
2.	Acetazolamid	β-cyklodekstryna, chitozan, laktoza, stearynian magnezu, mannitol, meglumina, metyloceluloza, poliwinylopirolidon, skrobia	DSC, TG, FT-IR, XRPD, FA	Rojek & Wesołowski, 2019
3.	Atenolol	β-cyklodekstryna, metyloceluloza, skrobia, chitozan	DSC, TG, FT-IR, XRPD, PCA, CA	Rojek & Wesołowski 2016
4.	Atowakwon	hydroksypropylometyloceluloza, glikol polietylenowy 8000, Polaxamer 188, stearynian magnezu, monohydrat laktozy, ditlenek tytanu, tlenek żelaza, celuloza mikrokrystaliczna, glikolan sodowy skrobi	DSC, HSM, FT-IR, XRPD	Chavan & Shastri, 2018
5.	Baklofen	mannitol, laktoza, skrobia, metyloceluloza, β-cyklodekstryna, meglumina, chitozan, PVP-30, stearynian magnezu	DSC, DTA, TG, DTG, IR, XRPD, PCA, CA	Rojek et al., 2013
6.	Diazepam	monohydrat laktozy, celuloza mikrokrystaliczna, preżelowana skrobia, glikolan sodowy skrobi, kroskarmeloza sodowa, koloidalny ditlenek krzemu, stearynian magnezu, talk	DSC, TG, IR	Matos et al., 2017
7.	Diklofenak sodowy	kopolimer metakrylanu amoniowego	DSC, TG, Raman	Sipos et al., 2008
8.	Glipizyd	octan celulozy, koloidalny ditlenek krzemu, laktoza, mannitol, celuloza mikrokrystaliczna, chlorek sodu, poliwinylopirolidon, meglumina, glikol polietylenowy, stearynian magnezu, talk	DSC, IR, IST	Verma & Garg, 2005
9.	Hydrokortyzon	mannitol, laktoza, skrobia, metyloceluloza, β-cyklodekstryna, meglumina, chitozan, PVP-30, stearynian magnezu	DSC, TG, DTG, IR, XRPD, PCA, CA	Rojek & Wesołowski, 2017
10.	Ibuprofen	glinokrzemian magnezu	DSC, TG-MS, FT-IR, NMR	Krupa et al., 2010
11.	Itrakonazol, benznidiazol	β-cyklodekstryna, 2-hydroksypropylo-β-cyklodekstryna, metylowana β- cyklodekstryna, hydroksypropylometyloceluloza, poliwinylopirolidon, stearynian magnezu	DSC, TG, DTG, FT-IR, PLM	Silva et al., 2014
12.	Kofeina	glikokol, sorbitol, glukoza, sacharoza, celuloza mikrokrystaliczna, guma arabska	DSC, TG, FT-IR, XRPD, ANN	Rojek et al., 2018

13.	Mesylan imatinibu	poliwinylopirolidon (powidon), stearynian magnezu, celuloza mikrokrystaliczna testy stabilności – długoterminowy i w warunkach przyśpieszonych	DSC, TG, FT-IR, XRPD	Łaszcz et al., 2007
14.	Metronidazol	hydroksypropylometyloceluloza, tlenek polietylenu, celuloza mikrokrystaliczna, dihydrat dwuzasadowego fosforanu wapnia, bezwodny dwuzasadowy fosforan wapnia	DSC, TG, NIR	Kiss et al., 2006
15.	Nowa substancja lecznicza przeciwpasożytnicza	celuloza mikrokrystaliczna, β-cyklodekstryna, poliwinylopirolidon, Septrap 80, koloidalny ditlenek krzemu, siarczan laurylosodowy, skrobia, stearynian magnezu, laktoza kinetyka rozkładu termicznego	DSC, TG, IR	Costa et al., 2013
16.	Paracetamol, maleinian chlorfeniraminy, chlorowodorek fenylefryny	laktoza, celuloza mikrokrystaliczna, kroskarmeloza, krzemionka koloidalna, mannitol, stearynian magnezu	DSC, TG, DTG	Oliveira et al., 2017
17.	Pochodne morfiny	α-L-dipalmitoil fosfatydylocholiny	DSC, EPR	Budai et al., 2003
18.	Prymachina	hydroksypropylometyloceluloza, celuloza mikrokrystaliczna, skrobia, laktoza, koloidalny ditlenek krzemu, tlenek polietylenu, talk, kwas stearynowy, trójzasadowy fosforan wapnia, monostearynian glicerolu, mannitol, poliwinylopirolidon (powidon), fumaran sodowo stearylowy, alkohol stearylowy, stearynian magnezu kinetyka rozkładu termicznego	DSC, TG, FT-IR	Bertol et al., 2010
19.	Rysperydon	siarczan laurylosodowy, skrobia, celuloza mikrokrystaliczna, bezwodna laktoza, stearynian magnezu	DSC, TG, DTG, XRPD, FT- IR, SEM, LC	Daniel et al., 2013
20.	Teneligliptin	preżelowana skrobia, kroskarmeloza sodowa, glikolan sodowy skrobi, celuloza mikrokrystaliczna, stearynian magnezu	DSC, TG, FT-IR, XRPD, PLM, IST, HPLC, LC-MS	Ali et al., 2018

Skróty metod analitycznych: ANN – sztuczne sieci neuronowe; CA – analiza skupień; DSC – różnicowa kalorymetria skaningowa; DTG – różniczkowa termograwimetria; EPR – elektronowy rezonans paramagnetyczny; FA – analiza faktorowa; FT-IR – spektroskopia IR z transformacją Fouriera; HSM – termomikroskopia; IR – spektroskopia w podczerwieni; IST – test izotermicznego stresu; LC – chromatografia cieczowa; LC-MS – chromatografia cieczowa sprzężona z spektrometrem mas; NIR – spektroskopia w bliskiej podczerwieni; NMR – spektroskopia magnetycznego rezonansu jądrowego; PCA – analiza głównych składowych; PLM – mikroskopia optyczna w świetle spolaryzowanym; Raman – spektroskopia Ramana; SEM – elektronowy mikroskop skaningowy; TG – termograwimetria; TG-MS – TG sprzężona z spektrometrem mas; XRPD – proszkowa dyfraktometria rentgenowska. Użycie DSC do badania zgodności/niezgodności może niejednokrotnie prowadzić do błędnych lub niejednoznacznych wniosków [Shantikumar et al., 2014]. Wynika to z faktu, że pomiary DSC prowadzone są zwykle do temperatury 300°C lub wyższej, natomiast w realnych sytuacjach produkty farmaceutyczne nie są narażone na tak wysokie temperatury. Ponadto, wykrywanie niezgodności może być problematyczne w przypadku składników, których piki DSC związane z topnieniem nakładają się na siebie częściowo lub całkowicie i gdy pojawiają się dodatkowe efekty wynikające z utworzenia eutektyku [Chadha & Bhandari, 2014], a także, gdy substancja lecznicza nie topi się [Veiga et al., 2018]. Trudności w interpretacji krzywych DSC mogą być także spowodowane rozpuszczaniem jednego ze składników w fazie ciekłej utworzonej w wyniku stopienia drugiego składnika [Narsai et al., 1997].

W przeciwieństwie do DSC, krzywe TG wskazują zakres temperatury, w którym następuje rozkład termiczny badanej próbki wraz z towarzyszącym mu ubytkiem masy, i z tego powodu ich zastosowanie do wykrywania niezgodności między składnikami jest znacznie ograniczone [Bruni et al., 2002]. W związku z trudną interpretacją tych krzywych (podobna sytuacja występuje również podczas interpretacji widm IR), podjęto badania nad włączeniem do ich interpretacji zaawansowanych metod analizy wielowymiarowej, tj. analizy głównych składowych (*Principal Component Analysis*, PCA) i analizy skupień (*Cluster Analysis*, CA) w celu wykazania, w jakim zakresie obie techniki chemometryczne mogą być użyteczne jako metody wspomagające interpretację krzywych TG i widm IR pod kątem identyfikacji niezgodności między składnikami.

Badania dwuskładnikowych mieszanin fizycznych substancji czynnych (acetazolamid, atenolol, baklofen i hydrokortyzon) z substancjami pomocniczymi (mannitol, laktoza, skrobia, metyloceluloza, β-cyklodekstryna, meglumina, chitozan, poliwinylopirolidon K-30 i stearynian magnezu) wykazały, że wielowymiarowe techniki eksploracji danych są nadzwyczaj przydatne podczas interpretacji krzywych TG i widm FT-IR [Rojek & Wesołowski, 2019; Rojek & Wesołowski, 2017; Rojek & Wesołowski, 2016; Rojek et al., 2013; Wesołowski & Rojek, 2013; Wesołowski et al., 2012a]. Wyniki obliczeń PCA i CA wskazujące na zgodność lub niezgodność między potencjalnymi składnikami produktów farmaceutycznych w oparciu o dane uzyskane na podstawie krzywych TG lub widm FT-IR prawie we wszystkich przypadkach zostały potwierdzone przez dane uzyskane za pomocą DSC i XRPD. Dowodzi to, że obie metody eksploracji danych mogą być pomocne w technologii farmaceutycznej, szczególnie w procesie preformulacji.

#### 4.3. Analiza czystości

Do badania czystości substancji farmaceutycznych i identyfikacji zanieczyszczeń stosuje się przede wszystkim wysokosprawną chromatografię cieczową (*High-performance liquid chromatography*, HPLC) oraz GC, często sprzężone z MS [Kamboj et al., 2014; Nagpal et al., 2011]. Analiza czystości tymi metodami jest jednak dość czasochłonna, dlatego wciąż poszukuje się metod odznaczających się krótszym czasem wykonania analizy i za pomocą których można dokonać pomiarów z porównywalną do HPLC lub GC wiarygodnością. Badania wskazują na możliwość użycia DSC lub DTA jako metod alternatywnych lub wspomagających ocenę czystości substancji o dużym znaczeniu dla farmacji.

Podstawę do zastosowania DSC w ocenie czystości substancji organicznych stanowi fakt, iż zanieczyszczenia wpływają na temperaturę, kształt i powierzchnię endotermicznego piku DSC/DTA związanego z topnieniem [Wesołowski, 2003]. Temperatury – początku i piku ulegają przesunięciu w kierunku niższych wartości, a ich obniżenie jest proporcjonalne do ułamka molowego zanieczyszczeń. W związku z tym, czystość substancji można oszacować, porównując endotermiczny pik DSC substancji o wysokiej czystości (użytej jako wzorzec) z pikiem badanej próbki lub dokonując oznaczeń ilościowych na podstawie równania van't Hoff'a [Giron & Goldbronn, 1995; Grady et al., 1973; De Angelis & Papariello, 1968]. Równanie to przedstawia zależność pomiędzy obniżeniem temperatury topnienia badanej substancji a stężeniem zawartych w niej zanieczyszczeń:

$$T_s = T_o - \frac{RT_o^2 X}{\Delta H_f} \cdot \frac{1}{F}$$

w którym:  $T_s$  – temperatura badanej próbki,  $T_o$  – temperatura topnienia wzorca,  $\Delta H_f$  – entalpia topnienia wzorca, R – stała gazowa, F – ułamek molowy próbki stopiony do temperatury  $T_s$ , X – stężenie zanieczyszczeń w fazie ciekłej i stałej próbki (ułamek molowy zanieczyszczeń).

Równanie van't Hoff'a umożliwia szybką, dokładną i precyzyjną ocenę zawartości zanieczyszczeń w substancji o czystości wyższej niż 98–99%. Oznaczenia są możliwe przy założeniu, że zanieczyszczenia tworzą prosty układ eutektyczny z badaną substancją, przy czym nie mogą tworzyć roztworu stałego [Grady et al., 1973; Marti, 1972; De Angelis & Papariello, 1968]. Niedogodnością metody jest brak możliwości identyfikacji zanieczyszczeń. Nie jest także możliwa ocena czystości substancji amorficznych, solwatów i zanieczyszczeń związkami nieorganicznymi. Ponadto, badane substancje nie mogą ulegać rozkładowi podczas topnienia lub odznaczać się wysoką prężnością par, a także składniki badanej próbki nie mogą reagować między sobą lub z materiałem pojemników na próbki [Grady et al., 1973; Plato, 1972; Plato &

Glasgow, 1969]. Pewne trudności stwarza także analiza czystości związków odznaczających się niskimi wartościami entalpii topnienia [Grady et al., 1973].

Przykładem wykorzystania DSC w badaniu czystości substancji leczniczych jest analiza próbek teofiliny stosowanych jako certyfikowane materiały odniesienia [Ma et al., 2009]. Badania sprowadzały się do porównania wyników oznaczeń czystości metodami HPLC, LC-MS i DSC z zastosowaniem równania van't Hoff'a. Dane otrzymane za pomocą DSC (czystość 99,79%) były bardzo podobne do wyników uzyskanych za pomocą HPLC (99,75%), różniły się natomiast nieznacznie od wyników z pomiarów LC-MS (99,82%). Niepewność obliczona dla powyższych oznaczeń potwierdziła, że pomiary LC-MS odznaczały się najwyższą dokładnością. Ponadto, analiza z użyciem MS umożliwia identyfikację zanieczyszczeń, którymi okazały się pochodne metyloksantyny; 3-metyloksantyna i trimetyloksantyna. Podsumowując, czasochłonny i skomplikowany proces pomiaru LC-MS powoduje, że tylko w przypadku, gdy ocena czystości technikami DSC i HPLC różni się znacząco, należy korzystać z pomiarów techniką LC-MS.

Badano również czystość 16 potencjalnych wzorców do celów farmaceutycznych, które stanowiły zarówno substancje czynne (np. kofeina, kwas salicylowy, chlorowodorek labetalolu) jak i substancje pomocnicze (np. nipaginy P i M) [Mathkar et al., 2009]. Analiza statystyczna i ocena niepewności uzyskanych danych nie wskazała na istotne statystycznie różnice między wynikami otrzymanymi metodami DSC i HPLC. Na tej podstawie można stwierdzić, że metoda DSC może być wykorzystywana w procesie kontroli czystości wzorców analitycznych na równi z innymi metodami. Pewne problemy stwarza jednak analiza substancji o czystości poniżej 98% oraz substancji, których piki DSC nie są ostro zakończone. Poprawna ocena czystości nie jest też możliwa w przypadku, gdy temperatura topnienia badanej substancji jest zbliżona do jej temperatury rozkładu, np. w przypadku kofeiny i kwasu salicylowego.

# 4.4. Inne przykłady zastosowań

Efektem oddziaływań między substancjami może być utworzenie eutektyku, którego obecność wiąże się ze zmianą właściwości fizykochemicznych substancji tworzących eutektyk, głównie rozpuszczalności, skutkiem czego może ulec zmianie ich biodostępność [Bi et al., 2003; Karolewicz et al., 2012b]. W badaniu równowag fazowych w układach dwu- lub wieloskładnikowych nieocenione są metody analizy termicznej. Zastosowanie DSC lub DTA umożliwia poprawną konstrukcję diagramu fazowego, na podstawie którego można wyznaczyć skład eutektyku oraz jego temperaturę i ciepło topnienia. Ciepło topnienia ma wartość największą dla mieszaniny o składzie eutektyku. Diagram fazowy umożliwia więc nie tylko

określenie, jakie są obecne fazy i jaki jest ich skład, ale też, jaka jest ich ilość. Z uwagi na wysoką czułość, metody DSC i DTA są również nieocenione podczas wykrywania bardzo małych ilości eutektyku w mieszaninie.

Słabą rozpuszczalność w wodzie większości substancji czynnych można poprawić nie tylko tworząc eutektyki, ale także rozpraszając je w stałych, obojętnych dla zdrowia człowieka nośnikach [Karolewicz et al., 2012a]. Są to tzw. stałe układy dyspersyjne, składające się co najmniej z dwóch substancji, tj. hydrofilowego nośnika w postaci krystalicznej lub amorficznej i hydrofobowej substancji leczniczej. W roli nośników występują najczęściej kwasy organiczne, związki azotowe, proste węglowodany, polimery oraz pochodne celulozy. Prowadzą one do zmniejszenia wymiarów kryształków trudnorozpuszczalnej substancji czynnej i zwiększenia ich liczby, zwiększając tym samym wydatnie powierzchnię kontaktu substancji rozpuszczanych z rozpuszczalnikiem. W konsekwencji istotnie wpływają na rozpuszczalność oraz inne, istotne z punktu widzenia technologii farmaceutycznej właściwości fizykochemiczne hydrofobowych substancji czynnych [Huang & Dai, 2014; Karataş & Bekmezci, 2013; Fattah et al., 2012; Narang et al., 2012].

Metody takie, jak DSC, DTA i HSM są najczęściej stosowanymi metodami analizy termicznej w badaniu stałych układów dyspersyjnych [Tian et al, 2015; Karolewicz et al., 2012b; Zhao et al., 2011]. Interpretację wyników analizy termicznej wspomagają FT-IR, SEM, PLM i analiza rozpuszczalności substancji leczniczej. Szczególnie przydatna jest natomiast dyfrakcyjna analiza rentgenowska (XRPD), która jest jedyną metodą w przypadku, gdy trzeba określić skład fazowy prostych mieszanin lub gdy trzeba ustalić stosunek form, bezpostaciowej do krystalicznej, i przeprowadzić pomiar wielkości kryształków. Przegląd piśmiennictwa nt. zastosowania w praktyce farmaceutycznej stałych układów dyspersyjnych przedstawiono w czasopiśmie Polimery w Medycynie [Karolewicz et al., 2012b].

Metody analizy termicznej są też podstawowymi technikami w badaniu kompleksów inkluzyjnych z cyklodekstrynami [Brewster & Loftsson, 2007; Mura et al., 2003; Giordano et al., 2001] i ko-kryształów [Garbacz & Wesołowski, 2018; Sathisaran & Dalvi, 2018; Pindelska et al., 2017; Saganowska & Wesołowski, 2017]. Kompleksy inkluzyjne i ko-kryształy różnią się pod względem niektórych właściwości fizykochemicznych od wchodzących w ich skład substancji leczniczych. Z reguły są lepiej rozpuszczalne w wodzie, bardziej trwałe, mogą maskować nieprzyjemny smak lub zapach substancji czynnych.

Powierzchnia cyklodekstryny ma charakter hydrofilowy i dlatego rozpuszcza się w wodzie, natomiast trudnorozpuszczalna substancja czynna umiejscowia się w hydrofobowym wnętrzu cyklodekstryny, dzięki czemu utworzenie kompleksu inkluzyjnego w dużym stopniu poprawia rozpuszczalność substancji leczniczej [Brewster & Loftsson, 2007; Giordano et al., 2001]. Do kompleksowania hydrofobowych substancji stosuje się najczęściej β-cyklodekstrynę i 2-hydroksypropylo-β-cyklodekstrynę. Przykładem są kompleksy inkluzyjne z salicylamidem, na podstawie których wykazano, że zanik endotermicznego piku DSC w zakresie temperatur 137–142°C, związanego z topnieniem salicylamidu, wskazuje na tworzenie się kompleksu [Kosecka-Judin et al., 2012]. W mieszaninach fizycznych pik ten występuje wskazując, że zmieszanie cyklodekstryny z salicylamidem nie prowadzi do utworzenia kompleksu.

Ko-kryształy to kolejna możliwość stworzenia układu o pożądanych właściwościach substancji czynnej. Duże zainteresowanie techniką DSC w badaniu ko-kryształów wynika z faktu, że temperatura topnienia jest istotną właściwością fizyczną ulegającą zmianie podczas kokrystalizacji [Saganowska & Wesołowski, 2018]. Stwierdzono, że im wyższa temperatura topnienia ko-kryształu, tym niższa rozpuszczalność i wyższa trwałość [Bronowicz et al., 2016]. W większości przypadków temperatura topnienia ko-kryształu znajduje się między temperaturą topnienia substancji czynnej i koformera, bądź jest niższa od temperatur obu składników. Za pomocą DSC można również skonstruować diagramy fazowe wskazując, czy utworzył się kokryształ, czy eutektyk.

Metody analizy termicznej są także stosowane w badaniu procesów degradacji i rozkładu termicznego substancji farmaceutycznych [Mohamed & Attia, 2017; Roumeli et al., 2013; Łaszcz et al., 2011; Łaszcz et al., 2010; Galwey, 2007; Waterman & Adami, 2005; Ŝimon et al., 2004; Giordano et al., 2003; Ruiz et al., 1998]. Poznanie odporności na temperaturę substancji leczniczej, tzn. jej zachowania się w warunkach o różnej temperaturze i wilgotności względnej jest niezbędne, zarówno z punktu widzenia technologii postaci leku, jak i określenia warunków przechowywania i daty ważności gotowych produktów farmaceutycznych.

Za pomocą metod analizy termicznej badano rozkład w warunkach nie-izotermicznych szeregu organicznych i nieorganicznych substancji leczniczych. Krzywe DTA, TG i DTG destrukcji termicznej sulfonamidów wskazały na wpływ struktury chemicznej tych związków na charakterystykę ich rozkładu termicznego [Wesołowski et al., 2003]. Porównując trwałość sulfadiiminy, sulfatiazolu i sulfametoksydiazyny wykazano, że podstawnik heterocykliczny wywiera wpływ na trwałość podstawowej struktury tych związków. Sulfonamidy zawierające podstawniki pirymidynowe (sulfadiimina i sulfametoksydiazyna) też zachowują się podobnie. Z kolei izotiocyjanowe pochodne sulfonamidów ulegają rozkładowi w niższych temperaturach, ale ich rozkład przebiega wolniej i kończy się w zakresie wyższych temperatur. Podobne badania przeprowadzono również w przypadku aminokwasów wskazując na wpływ struktury

chemicznej na rozkład termiczny badanych związków [Wesołowski & Erecińska, 2012; Wesołowski & Erecińska, 2005].

Wiele substancji leczniczych krystalizuje łącznie z cząsteczkami wody jako integralną częścią struktury krystalicznej tworząc tzw. hydraty [Łaszcz & Witkowska, 2016; Giron et al., 2002; Han et al., 1998; Han & Suryanarayanan, 1997; Marini et al., 1996; Khankari & Grant., 1995]. Woda krystalizacyjna wpływa na właściwości fizykochemiczne substancji, głównie na trwałość i rozpuszczalność. Ma to istotne znaczenie w technologii farmaceutycznej. Układ krystaliczny hydratów może także ulec zniszczeniu pod wpływem temperatury lub czynników mechanicznych, takich jak rozdrabnianie lub rozcieranie. Przykładem mogą być badania DSC, TG, XRPD i SEM, które wykazały, że poddanie trihydratu cefiksymu działaniu obu procesów skutkuje osłabieniem wiązań pomiędzy cząsteczkami wody krystalizacyjnej i substancją leczniczą [Kitamura et al., 1989]. Siatka krystaliczna ulega zniszczeniu, powodując obniżenie trwałości bezwodnej substancji. Objawia to się, m.in. zmianą koloru substancji spowodowaną pojawieniem się produktów degradacji.

### 5. Pozostałe metody analizy termicznej

Dane zestawione w Tabeli 2 wskazują, że poza DSC i TG o niekwestionowanej użyteczności w badaniach nad lekiem, znanych jest wiele innych technik analizy termicznej [Lever et al., 2014; Haines, 2002], których przydatność w rozwiazywaniu różnych problemów w obszarze analizy i technologii farmaceutycznej jest dopiero oceniana [Maheswaram et al., 2013; Jones et al., 2012; Osman, 2012; Thakur et al., 2012; Abiad et al., 2010; Price et al., 2000]. Spośród tych technik wymienić należy analizę termomechaniczną (*Thermomechanical analysis*, TMA), dynamiczną analize mechaniczną (*Dynamic mechanical analysis*, DMA) i analizę dielektryczną (*Dielectric analysis*, DEA). Wybrane przykłady zastosowania tych metod w badaniu substancji i produktów farmaceutycznych zestawiono w Tabeli 7.

Analiza termomechaniczna (TMA) jest ogólnym terminem obejmującym zespół metod umożliwiających badanie zmian wymiarów liniowych lub objętości próbki oraz jej właściwości mechanicznych w funkcji temperatury lub czasu [Haines, 2002; Hatakeyama & Zhenhai, 1998]. Pomiar polega na ogrzewaniu lub chłodzeniu badanego materiału z określoną szybkością lub na utrzymywaniu go w stałej temperaturze (pomiar izotermiczny). Zastosowanie technik TMA sprowadza się do pomiaru rozszerzalności liniowej testowanego materiału, do badania wpływu na próbkę sił zginających (deformacja pod wpływem określonego nacisku), rozciągających (elongacja), ściskających (kompresja) lub ścinających. W farmacji techniki TMA stosuje się w szczególności do badania procesów zeszklenia, mięknienia, pęcznienia, topnienia i krystalizacji, a także do badania przemian polimorficznych.

Dynamiczna analiza mechaniczna (DMA) polega na pomiarze zmian właściwości mechanicznych badanego materiału pod wpływem przyłożonej siły zewnętrznej o charakterze oscylacyjnym w funkcji temperatury lub czasu [Haines, 2002; Hatakeyama & Zhenhai, 1998]. Częstość oscylacji można zmieniać w zakresie od 0 do 100 Hz, zależnie od rodzaju przyrządu do pomiaru DMA. Próbka ulegając drganiom gnącym lub deformacyjnym generuje drgania sinusoidalne, które porównuje się z drganiami pobudzającymi próbkę. Pomiar wykonuje się specjalnym analizatorem fourierowskim. W DMA przyjmuje się, że badany materiał pod względem swych właściwości mechanicznych mieści się pomiędzy ciałem sprężystym Hooke'a a ośrodkiem lepkim (materiał lepkosprężysty). DMA jest szczególnie przydatna do badania polimerów [Hatakeyama & Zhenhai, 1998]. Pozwala wyznaczać temperaturę zeszklenia i mięknięcia, a także umożliwia ocenę procesów topnienia i krystalizacji polimerów, substancji farmaceutycznych i produktów spożywczych [Pielichowski, 2009].

Przemianom fazowym w ciałach stałych, jak również ich topnieniu towarzyszy zmiana przewodnictwa elektrycznego wywołana zmianą ruchliwości jonów w strukturze lub zmianą poziomów elektronowych [Stoch, 1998]. Pomiar zmiany przewodnictwa elektrycznego w funkcji temperatury jest z tego względu użyteczny w badaniu przemian fazowych i okazał się szczególnie pomocny podczas wyznaczania temperatury topnienia, badania czystości substancji oraz wyznaczania temperatur przemian polimorficznych. Do pomiaru wielkości elektrycznego typołecznych, tj. przewodnictwa i pojemności, w funkcji czasu, temperatury i częstości pola elektrycznego wykorzystuje się analizę dielektryczną (*Dielectric analysis*, DEA).

Bardzo pomocne w badaniu degradacji i rozkładu termicznego substancji są także metody umożliwiające wykrywanie gazowych produktów rozkładu (EGD) oraz ich analizę ilościową (EGA), a ponadto termomikroskopia (HSM). Wykrywanie wydzielającego się gazu (EGD) w trakcie analizy termicznej polega najczęściej na pomiarze zmian jego ciśnienia lub objętości [Stoch, 1998]. Wykorzystuje się też charakterystyczne reakcje chemiczne. Inny sposób polega na pomiarze różnicy właściwości fizycznych gazu nośnego (azotu, argonu, helu), przepływającego przez komorę pomiarową z badaną próbką, w której znajdują się też składniki gazowe wydzielane z podgrzewanej próbki, z właściwościami czystego gazu nośnego. Mierzy się różnicę gęstości lub przewodnictwo cieplne tych gazów. Pomiary dokonywane są w oparciu o różnego typu detektory, np. spektrometr mas lub IR, detektory – płomieniowo-jonizacyjny, termokonduktometryczny, ciśnieniowe lub chemiczne z komórkami do miareczkowania.

Tabela 7 Przykłady zastosowania pozostałych technik analizy termicznej w badaniu substancji i produktów farmaceutycznych.

Lp.	Badane substancje	Rozpatrywane problemy	Metody badań	Piśmiennictwo
1.	Acetofenetydyna, kofeina, wanilina	Badając właściwości substancji w zakresie temperatur $30-100^{\circ}$ C stwierdzono, że poniżej temperatury topnienia analizowane związki miękną, a ich przewodnictwo elektryczne wzrasta wraz ze wzrostem temperatury, co odzwierciedla silna zależność ( $R^2 = 0.95$ ) pomiędzy temperaturą mięknięcia wyznaczoną z TMA a przewodnictwem elektrycznym uzyskanym z DEA.	TMA, DEA, DSC	Thakur et al., 2012
2.	Celekoksyb	Badając wpływ temperatury, ciśnienia i wilgotności powietrza na proces rekrystalizacji amorficznego celekoksybu udowodniono, że temperatura i wilgotność są głównymi czynnikami pobudzającymi rekrystalizację. Wykazano ponadto, że test przyśpieszonego starzenia (40°C/75% RH) powoduje całkowitą rekrystalizację amorficznego celekoksybu w ciągu 15 dni.	DMA, DSC, FT-IR	Gupta & Bansal, 2005
3.	Cytokiny związane z patogenezą malarii	Na podstawie analizy w warunkach izotermicznych i dynamicznych mikrogramowych stężeń uwodnionych, rekombinowanych cytokin i rozpuszczalnych receptorów cytokinowych uzyskano wyraźne i odtwarzalne widma dielektryczne tych protein. Opracowane na ich podstawie dielektryczne podpisy dla każdego badanego białka umożliwiają opracowanie czułych dielektrycznych sensorów zdolnych do wykrycia cytokin i receptorów cytokinowych w płynach ludzkich (np. w ślinie) celem diagnozy malarii.	DETA, TG, DTG	Saleh et al., 2012
4.	Cytokiny związane z patogenezą malarii	Zawieszone w różnych rozpuszczalnikach liofilizowane cytokiny ludzkie i receptory cytokinowe analizowano różnymi technikami w celu stwierdzenia, czy można je zróżnicować biorąc pod uwagę przewodnictwo elektryczne i energię aktywacji. Wykazano, że poszczególne białka różnią się przewodnictwem elektrycznym, co może mieć duże znaczenie w diagnostyce malarii.	DETA, TG, DTG	Moreno-Molek et al., 2012
5.	Cytokiny związane z patogenezą malarii	Kontynuowano badania nad właściwościami termicznymi 5 ludzkich cytokin celem opracowania odpowiednich testów do diagnozy malarii. Stwierdzono, że poszczególne cytokiny różnią się wartościami pików częstości oraz że wyraźne i odtwarzalne widma dielektryczne protein mogą być wykorzystane jako specyficzne sensory do identyfikacji cytokin w roztworach.	DETA, TG, DSC	Saleh et al., 2013
6.	Ekstrakt garbników z Acacia nilotica spp. nilotica	W badaniach wykorzystano suszony rozpyłowo ekstrakt. Skoncentrowano się na badaniu reakcji autokondensacji i kopolimeryzacji tanin z akacji przy różnych wartościach pH pod kątem ich przydatności jako preparatów adhezyjnych.	ТМА	Osman, 2012

7.	Galaktomanozyd	Galaktomannozyd, polisacharyd uzyskany z nasion szarańczyna strąkowego (drzewa karobowego) wykazuje zdolność do tworzenia hydrożeli w środowisku wodnym. Otrzymując hydrożel techniką zamrażania-rozmrażania, badano wpływ różnych szybkości chłodzenia na proces żelowania. Wykazano, że wielkość kryształów lodu wpływa bezpośrednio na strukturę usieciowienia hydrożeli.	TMA, DSC	Iijima et al., 2012
8.	Gryzeofulwina, felodypina, indometacyna	Opracowano nowy sposób pomiaru właściwości termomechanicznych (przemiana szklista, topnienie, rekrystalizacja) sproszkowanych substancji farmaceutycznych i polimerów w oparciu o zmianę ich właściwości pod wpływem oscylacyjnego ściskania w kontrolowanych warunkach temperatury. Wykazano, iż uzyskane temperatury topnienia i zeszklenia są zgodne z wartościami otrzymanymi za pomocą technik DSC i DMA.	DMA, DSC	Abiad et al., 2010
9.	Guma cynamonowa	Badano właściwości lepkosprężyste hydrożeli uzyskanych techniką zamrażania i rozmrażania 0,1–1,5% wodnych roztworów żywicy cynamonowej ze wskazaniem czynników wpływających na właściwości hydrożeli. Stwierdzono, że szybkość zamrażania wyraźnie wpływa na zdolność roztworu do żelowania.	ТМА	Iijima et al., 2013
10.	Hydroksypropylo metyloceluloza, celuloza mikrokrystaliczna, monohydrat laktozy	Oceniając właściwości błon o matrycy hydrofilowej, tworzących się w procesie granulacji w małej skali wykazano, że wzrost zawartości laktozy w stosunku do HPMC obniża temperaturę zeszklenia błony wskutek interakcji między składnikami, natomiast przy stosunku obu składników 3:5 pojawia się druga przemiana szklista wskazująca na utworzenie odrębnej fazy bezpostaciowej laktozy.	TMA, DSC, XRPD	Bajdik et al., 2008
11.	Hydrożele pektyn	Przezroczyste i elastyczne hydrożele otrzymane w wyniku ogrzewania wodnych roztworów pektyny, a następnie dodania do nich roztworu chlorku wapnia, badano w zakresie temp. 30–80°C w specjalnie do tego celu skonstruowanym pojemniku na próbkę. Wykazano, że współczynnik płynięcia hydrożelu wzrasta wraz ze wzrostem temperatury pęcznienia oraz zmniejsza się wraz ze wzrostem wskaźnika usieciowienia.	ТМА	Iijima et al., 2005
12.	Hydrożele polisacharydowe	W badaniu hydrożeli polisacharydowych zastosowano specjalnie skonstruowaną komórkę pomiarową sprzężoną z TMA, umożliwiającą pomiar pęcznienia żelu. Urządzenie umożliwia rejestrację grubości filmu hydrożelu w funkcji czasu przy stałym obciążeniu, bezpośrednio po wprowadzeniu wody do komórki pomiarowej. Pomiary z użyciem tej komórki są szczególnie użyteczne podczas badania hydrożeli zawierających duże ilości wody.	ТМА	Iijima et al., 2001
13.	Indometacyna	Badano wpływ wilgotności powietrza (50, 60 i 75% RH) na proces krystalizacji amorficznej indometacyny w temperaturach 50 i 60°C. Z uzyskanych danych wyznaczono stałe szybkości krystalizacji dla określonych warunków pomiaru wskazując, że szybkość krystalizacji wzrasta wraz ze wzrostem temperatury i wilgotności powierza.	DMA	Soutari et al., 2012

14.	Indometacyna	Badając procesy transformacji w fazie stałej (przemiana szklista, krystalizacja, topnienie) za pomocą spektroskopii dielektrycznej o małej częstotliwości, w zakresie częstości 10 <sup>-3</sup> –10 <sup>6</sup> Hz i temperaturze 10–160°C udowodniono, że ta technika sprzężona z TMDSC może być użytecznym narzędziem do charakterystyk krystalicznych i amorficznych substancji leczniczych.	Spektroskopia dielektryczna, TMDSC	He & Craig, 2001
15.	Ketoprofen, lidokaina, kofeina	Badano mikrostruktury mikroemulsji i ich wpływ na przezskórne przenikanie modelowych substancji leczniczych.	przewodnictwo elektryczne, woltamperometria cykliczna, DLS, DSC	Zhang & Michniak- Kohn, 2011
16.	Kofeina	Zastosowano dwie nowe metody analizy termicznej, TMDSC i TMA, do badania przemian polimorficznych kofeiny.	TMA, DSC, TMDSC, HSM	Manduva et al., 2008
17.	Kwas acetylosalicylowy, ibuprofen, progesteron, quinidyna	Wykorzystano spektroskopię dielektryczną do badania relaksacji molekularnej wybranych substancji leczniczych w fazie szklistej i ultra lepkim stopie.	DSC, spektroskopia dielektryczna	Johari et al., 2007
18.	Peletki	Na przykładzie badań właściwości mechanicznych peletek wykazano, że użycie DMA umożliwia wyznaczenie dokładnej wartości modułu sprężystości podłużnej peletek (moduł Younga), wykrycie obecności odwracalnych deformacji sprężystych oraz określenie zmiany wartości kąta fazowego, który ilustruje wzrost lub obniżenie lepkosprężystości peletek w zależności od charakteru substancji pomocniczych użytych podczas ich formulacji.	DMA	Bashaiwoldu et al., 2004a
19.	Peletki	Wykazano potencjalną użyteczność DMA w opracowaniu składu otoczki peletek, która po stabletkowaniu umożliwi uzyskanie formy leku o kontrolowanym uwalnianiu substancji czynnej. Badano w tym celu sprężystość i lepkosprężystość peletek otrzymywanych różnymi metodami, bez powlekania i z powlekaniem błoną z etylocelulozy.	DMA	Podczeck & Almeida, 2002
20.	Peletki w otoczce	Badając wpływ substancji pomocniczych na właściwości mechaniczne modelowych peletek z paracetamolem i celulozą mikrokrystaliczną, otrzymanych w wyniku ekstruzji i sferonizacji stwierdzono, iż oddziaływanie błony pokrywającej peletki na ich właściwości mechaniczne uwarunkowane jest właściwościami rdzenia peletek. Wskazano ponadto na przewagę pomiarów DMA nad metodami klasycznymi opartymi na nieodwracalnej strukturalnej destrukcji peletek.	DMA	Bashaiwoldu et al., 2004b
21.	Polimery biomedyczne	Teoria użycia metody DMA dla stałych farmaceutycznych i biomedycznych systemów. Określenie możliwości zastosowań DMA do pomiarów i zrozumienia stanów przejść relaksacji i mieszalności w podwójnych i wieloskładnikowych systemach.	DMA	Jones et al., 2012
-----	--	---	---------------------------------	----------------------
22.	Preparaty z witaminą E Na przykładzie witaminy E ulegającej zeszkleniu podczas chłodzenia (temperatura zeszklenia ~100°C) wykazano, iż analiza dielektryczna o niskiej częstotliwości i DSC są komplementarnymi technikami umożliwiającymi badanie zachowania się substancji krystalicznych w niskich temperaturach.		DEA; DSC	Barker et al., 2000
23.	Roślinne surowce lecznicze	Analiza wysuszonych części morfologicznych roślin (korzeni, kłączy, kor, owoców, łupin, kwiatów, szpilek, gałązek, liści i ziół), napromieniowanych i nienapromieniowanych promieniowaniem γ o różnym natężeniu wykazała, iż termoluminescencja jest najbardziej wiarygodną metodą odróżniania próbek o różnym stopniu napromieniowania od próbek nienapromieniowanych.	TL; PPSL, EPR	Pal et al., 2009
24.	Silikonowe krążki dopochwowe	Opracowano nową metodę oznaczania substancji w silikonowych krążkach dopochwowych, polegającą na pomiarze obniżenia zależnej od stężenia składowej rzeczywistej modułu zespolonego związanej z topnieniem oznaczanej substancji, i ekstrapolacji uzyskanych danych do zerowej wartości tej składowej.	DMA, HPLC	Malcolm et al., 2002
25.	Substancje farmaceutyczne o małej masie cząsteczkowej	Poddano dyskusji dane literaturowe na temat wpływu szybkości chłodzenia i szybkości ogrzewania na temperatury przemian szklistych substancji otrzymywanych w wyniku ogrzania powyżej temperatury topnienia, a następnie szybkiego chłodzenia. Dyskutowano także nad wpływem szybkości ogrzewania na krystalizację oraz nad wpływem wygrzewania na małocząsteczkowe substancje lecznicze w stanie szklistym.	TMA, DMA, TBA, DSC, DTA, NMR	Kerč & Srčič, 1995

Skróty metod analitycznych: DEA – analiza dielektryczna; DETA – termiczna analiza dielektryczna; DLS – dynamiczne rozpraszanie światła; DMA – dynamiczna analiza mechaniczna; DSC – różnicowa kalorymetria skaningowa; DTG – różniczkowa termograwimetria; FT-IR – spektroskopia IR z transformacją Fouriera; HPLC – wysokosprawna chromatografia cieczowa; HST – termomikroskopia; NMR – spektroskopia magnetycznego rezonansu jądrowego; PPSL – fotolumiescencja stymulowana impulsami światła; TBA – analiza wyboczenia skrętnego; TG – termograwimetria; TL – termoluminescencja; TMA – analiza termomechaniczna; TMDSC – DSC z modulowaną temperaturą; XRPD – proszkowa dyfraktometria rentgenowska.

W metodzie polegającej na analizie wydzielonego gazu (EGA), do oznaczania składu chemicznego gazowych produktów rozkładu stosowane są różne metody analizy gazów. Odpowiednie urządzenie sprzęga się z aparatem do TG [Stoch, 1998]. Stosuje się zwykle miareczkowanie potencjometryczne gazów zaabsorbowanych przez odpowiednie roztwory, chromatografię gazową, chromatografię cienkowarstwową i spektrometrię mas.

Termomikroskop (HSM) umożliwia obserwację próbek pod mikroskopem w świetle przechodzącym lub odbitym w funkcji temperatury[Chadha et al., 2012; Steger et al., 2012; Vitez et al., 1998]. W tym celu mikroskop wyposażony jest w stolik grzewczy, pozwalający osiągnąć temperaturę próbki nawet do 1800°C. Mikroskop posiada również kamerę, której oprogramowanie umożliwia cyfrowe opracowywania zarejestrowanego obrazu.

## II. Cel pracy

Celem pracy było ustalenie, w jakim stopniu wybrane techniki analizy termicznej: DSC, DTA, TG i DTG oraz spektroskopii w podczerwieni: FT-IR i Ramana, mogą być przydatne do oceny jakości aktywnych składników farmaceutycznych oraz zawierających je produktów farmaceutycznych i suplementów diety, na podstawie wykonanych w stanie stałym badań rozkładu termicznego i odporności na degradację oraz w oparciu o analizę współczynników podobieństwa widm spektroskopowych.

Realizacja celu pracy obejmowała zbadanie przy użyciu metod analizy termicznej – DSC, DTA, TG i DTG rozkładu termicznego stosowanych w lecznictwie pochodnych puryny i związków magnezu wraz z określeniem etapów ich degradacji termicznej. Do interpretacji danych otrzymanych z krzywych DTA, TG i DTG badanych substancji zastosowano analizę głównych składowych (*Principal Component Analysis*, PCA), która umożliwiła określenie związku pomiędzy masą próbki i szybkością ogrzewania dla każdej z badanych substancji. PCA zastosowano również do poszukiwania relacji pomiędzy strukturą chemiczną a rozkładem termicznym badanych związków.

W kolejnym etapie pracy zamierzano sprawdzić, w jakim stopniu uzyskane dane mogą zostać użyte do potwierdzenia obecności badanych substancji leczniczych w produktach farmaceutycznych i suplementach diety zawierających te substancje i ponadto, kilka (lub kilkanaście) substancji pomocniczych. Dla celów porównawczych badania rozszerzono o zastosowanie w tym samym celu spektroskopii FT-IR i Ramana. Badania zostały również poszerzone o analizę produktów farmaceutycznych wytwarzanych przez różne firmy, ale zawierających tę samą substancję czynną w różnych ilościach. W ten sposób możliwe było oszacowanie wpływu substancji pomocniczych, ich rodzaju i ilości, na możliwość potwierdzenia obecności substancji czynnej w produkcie, a także określenie, w jakim stopniu wybrane techniki analizy termicznej i spektroskopii w podczerwieni mogą być przydatne do kontroli składu dostępnych w obrocie produktów farmaceutycznym i suplementów diety.

Do badań wybrano techniki DSC, FT-IR oraz spektroskopię Ramana z uwagi na fakt, że umożliwiają one szybkie wykonanie pomiarów przy użyciu kilkumiligramowych próbek, eliminując jednocześnie czasochłonny proces izolacji substancji leczniczej ze złożonych matryc, jakimi są badane produkty.

# III. Część doświadczalna

#### 1. Materiały

W pracy wykorzystano stosowane w lecznictwie pochodne puryny i związki magnezu. Pod względem czystości substancje te odpowiadały wymaganiom farmakopealnym i poddano je badaniom bez wstępnego oczyszczenia. Przedsiębiorstwa, z których uzyskano substancje do badań podano w nawiasach.

Pochodne puryny (metyloksantyny): teofilina, 1,3-dimetylo-3,7-dihydro-1*H*-puryno-2,6-dion,  $C_5H_2O_2N_4(CH_3)_2$  (A.C.E.F., Fiorenzuola D'arda, Piacenza, Włochy); teobromina, 3,7-dimetylo-3,7-dihydro-1*H*-puryno-2,6-dion,  $C_5H_2O_2N_4(CH_3)_2$  (Pharma-Zentrale Gmbh, Herdecke, Niemcy); kofeina, 1,3,7-trimetylo-3,7-dihydro-1*H*-puryno-2,6-dion,  $C_5HO_2N_4(CH_3)_3$  (A.C.E.F., Fiorenzuola D'arda, Piacenza, Włochy); diprofilina, 7-[(2*RS*)-2,3-dihydroksy-propylo]-1,3-dimetylo-3,7-dihydro-1*H*-puryno-2,6-dion,  $C_5HO_2N_4(CH_3)_2$ ·C<sub>3</sub>H<sub>5</sub>(OH)<sub>2</sub> (Polfa, Kraków); aminofilina, 1,3-dimetylo-3,7-dihydro-1*H*-puryno-2,6-dion,  $C_5H_2O_2N_4(CH_3)_2$ ·C<sub>2</sub>H<sub>8</sub>N<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O (Pharma-Zentrale Gmbh, Herdecke, Niemcy).

Związki magnezu, w tym sole magnezu kwasów organicznych i nieorganicznych: tetrahydrat octanu magnezu, Mg(CH<sub>3</sub>COO)<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O (POCh, Gliwice); hydrat walproinianu magnezu, dipromal, Mg[C<sub>4</sub>H<sub>8</sub>(C<sub>3</sub>H<sub>7</sub>)COO]<sub>2</sub>·H<sub>2</sub>O (ICN Polfa, Rzeszów); hydrat mleczanu magnezu, hydrat α-hydroksypropionianu magnezu Mg[CH<sub>3</sub>CH(OH)COO]<sub>2</sub>·H<sub>2</sub>O (Sanofi-Biocom, Rzeszów); cytrynian magnezu, 2-hydroksy-1,2,3-propanotrikarboksylan magnezu, Mg<sub>3</sub>[HOC(CH<sub>2</sub>COO)<sub>2</sub>COO]<sub>2</sub> (Krka, Warszawa); tetrahydrat wodoroasparaginianu magnezu, Mg[NH<sub>2</sub>CH(COOH)CH<sub>2</sub>COO]<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O (Novichem, Chorzów); wodoroasparaginian cynku, Zn[NH<sub>2</sub>CH(COOH)CH<sub>2</sub>COO]<sub>2</sub> (Farmapol, Poznań) oraz węglan magnezu, chlorek magnezu, wodorotlenek magnezu i tlenek magnezu (POCh, Gliwice).

Z innych substancji leczniczych, do badań użyto: kwas acetylosalicylowy, etenzamid (Polpharma, Starogard Gdański); kwas askorbinowy (Merck, Darmstadt, Niemcy); kofeina, teofilina (Sigma-Aldrich, Steinheim, Niemcy); maleinian chlorfenaminy, chlorowodorek fenylefryny (Aflofarm, Łódź); fosforan kodeiny (Pharma Cosmetics, Kraków); diprofilina (Polfa, Kraków), paracetamol, propyfenazon (Polfa, Pabianice); chlorowodorek pirydoksyny (POCh, Gliwice); kwas foliowy i octan tokoferylu (Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA).

Produkty farmaceutyczne zawierające pochodne puryny: (nazwy producentów podano w nawiasach): Afonilum SR 375 (Abbott, Ludwigshafen, Niemcy); Apap Extra (US Pharmacia, Wrocław); Aspirin Activ (Bayer HealthCare, Leverkusen, Niemcy); Cefalgin (Polfa, Pabianice); Coffecorn mite, Coffecorn forte (Filofarm, Bydgoszcz); Coffepirine (Marcmed, Lublin); Diprophyllinum, Kofepar (Pliva, Kraków); Etopiryna (Polpharma, Starogard Gdański); Euphyllin long 200, Euphyllin long 300, Euphyllin CR (Altana Pharma, Konstanz, Niemcy); Grippostad C (Stada Arzneimittel, Bad Vilbel, Niemcy); Koferina, Kopiryna (Medicofarma, Radom); Panadol Extra, kapsułki Solpadeine, tabletki Solpadeine, Coldrex MaxGrip C (GlaxoSmithKline Consumer Healthcare, Warszawa); Saridon (Roche, Warszawa); Theoplus 100 mg, Theoplus 300 mg (Pierre Fabre Medicament, Boulogne, Francja); Theospirex retard 150 mg, Theospirex retard 300 mg (Biofarm, Poznań); Theovent 100, Theovent 300 (GlaxoSmithKline Pharmaceuticals Poznań).

Produkty farmaceutyczne i suplementy diety zawierające związki magnezu (nazwy producentów podano w nawiasach): Asmag, Asmag B, Asmag forte (Farmapol, Poznań); Aspargin, Filomag B<sub>6</sub> (Filofarm, Bydgoszcz); Asparaginum forte Mg + K (Polski Lek, Warszawa); Asparginian extra (Uniphar, Warszawa); Bio-Magnez (Pharma Nord, Vojens, Dania); BluMag Jedyny (Hasco-Lek, Wrocław); Cardiomin B<sub>6</sub> (Puritan's Pride, Bohema, USA); Chela-Mag B<sub>6</sub> (Olimp Labs, Dębica); Dipromal 200 mg (INC Polfa, Rzeszów); Dolomit VIS (VIS, Bytom); Laktomag B<sub>6</sub> (Chance, Czosnów); Maglek B<sub>6</sub> (Lek-Am, Zakroczym); Magne B<sub>6</sub>, Magne B<sub>6</sub> max (Sanofi-Aventis, Rzeszów); Magnefar B<sub>6</sub>, Magnefar B<sub>6</sub> (Golfarm, Poznań); Magnesol 150 (Krka, Novo Mesto, Słowenia); Magnezin (Polfa, Grodzisk Mazowiecki); Magvit B<sub>6</sub> (GSK Pharmaceuticals, Poznań); Mg B<sub>6</sub>, NeoMag Cardio, NeoMag forte (Aflofarm, Ksawerów); Slow-Mag, Slow-Mag B<sub>6</sub> (Curtis Healthcare, Poznań) oraz Zdrovit magnez + vit. B<sub>6</sub>, Zdrovit Magnum forte, Zdrovit Skurcz (NP Pharma, Ostrów Mazowiecki).

Substancje pomocnicze wykorzystane jako składniki badanych produktów farmaceutycznych i suplementów diety: celuloza mikrokrystaliczna, karboksymetyloceluloza sodowa (kroskarmeloza sodowa) (FMC Bio Polymer, Bruksela, Belgia); skrobia kukurydziana (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA); etyloceluloza, skrobia ziemniaczana, sacharoza (MP Biomedicals LLC, Illkirch Cedex, Francja); metyloceluloza, hydroksypropylo metyloceluloza (hypromeloza) (Shin-Etsu Chemical Co., Tokyo, Japonia); laktoza (PPH Galfarm, Kraków); stearynian magnezu (Sinochem, Jiangsu, Chiny); poliwinylopirolidon (powidon), kwas stearynowy (Fluka, Poznań); laurylosiarczan sodowy (Merck, Darmstadt, Niemcy); glikolan sodowy skrobi (JRS Pharma, Rosenberg, Niemcy). Wszystkie substancje użyto do badań bez dalszego oczyszczania.

## 2. Metody

Krzywe DTA, TG i DTG rozkładu termicznego badanych związków rejestrowano przy użyciu derywatografu OD-103 (MOM, Budapeszt, Węgry). Wszystkie analizy przeprowadzono w jednakowych warunkach. Odważki o masie 50, 100 i 200 mg ogrzewano w platynowych tyglach z szybkością wzrostu temperatury 3, 5, 10 i 15°C/min do temperatury końcowej 800°C. Rozkład przebiegał w statycznej atmosferze powietrza. Jako substancję wzorcową użyto α-Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>. Czułość DTA wynosiła 1/10 a DTG 1/5.

Interpretacja krzywych DTA polegała na wyznaczeniu temperatur – początku (T<sub>i</sub>) i końca (T<sub>f</sub>) piku oraz temperatury piku (T<sub>p</sub>) i zakresu temperatur ( $\Delta$ T) efektów endo- i egzotermicznych związanych z kolejnymi etapami rozkładu termicznego analizowanych związków. W przypadku krzywych TG i DTG odczytano temperatury początku (T<sub>i</sub>) i końca (T<sub>f</sub>) kolejnych etapów rozkładu, zakres temperatur tych etapów ( $\Delta$ T) oraz towarzyszące im ubytki masy ( $\Delta$ m). Z krzywych DTG wyznaczono ponadto temperatury pików (T<sub>p</sub>) dla kolejnych etapów rozkładu.

Pomiary kalorymetryczne badanych substancji, produktów farmaceutycznych i suplementów diety wykonano przy użyciu aparatu DSC 822<sup>e</sup>, typ heat flux (Mettler Toledo, Schwerzenbach Szwajcaria), z użyciem systemu chłodzenia ciekłym azotem (naczynie Dewara). Dokładnie odważone próbki ( $\pm$  0,01 mg, waga XA 105 Dual Range, Mettler Toledo, Schwerzenbach, Szwajcaria), o masie 5–10 mg umieszczano w 40 µL aluminiowych płaskodennych naczynkach zamkniętych od góry pokrywką z dwoma otworkami. Pomiary prowadzono w zakresie temperatur od 20°C do 400°C przy szybkości ogrzewania 10°C i 20°C/min w atmosferze azotu przepływającego z szybkością 70 ml/min. Każdą analizę powtarzano co najmniej trzykrotnie. Interpretacja krzywych DSC polegała na określeniu temperatur początku (T<sub>i</sub>) i końca (T<sub>f</sub>) piku oraz temperatur piku (T<sub>p</sub>) i ekstrapolowanej temperatury początku piku (T<sub>e</sub>), jak również zakresu temperatur pików endotermicznych ( $\Delta$ T), wysokości piku (h) i jego szerokości (w) przy użyciu oprogramowania STAR<sup>e</sup>.

Do kalibracji komory pomiarowej użyto indu (In) (99,999%) i cynku (Zn) (99,998%) (Impag AG, Zurych, Szwajcaria) jako substancji wzorcowych. Wartości referencyjne dla temperatury początkowej i strumienia ciepła wraz z granicami tolerancji były następujące: 156,6±0.3°C i 28,45±0.6 J/g dla indu; 419,6±0,7°C i 107,5±3,2 J/g dla cynku, natomiast wartości zmierzone wyniosły: 156,6°C i 28,80 J/g (ind); 420,1°C i 110,7 J/g (cynk). Kalibrację i wszystkie niezbędne korekty przeprowadzono przy pomocy programu komputerowego Calib DSC Total In/Zn (Mettler Toledo, Schwerzenbach Szwajcaria).

Widma FT-IR rejestrowano przy pomocy spektrometru Nicolet 380 (Thermo Fisher Scientific, Madison, USA), wyposażonego w detektor DTGS KBr. Przy pomocy prasy hydraulicznej (Specac, Orpington, Wielka Brytania) sprzężonej z membranową pompą próżniową (KNF, Neuberger, Francja), analizowanym próbkom nadano postać tabletek z KBr. Do przygotowania tabletek użyto 1 mg substancji badanej i 100 mg spektralnie czystego KBr (Merck, Darmstadt, Niemcy). Rejestrację widma dokonywano w zakresie spektralnym 4000–400 cm<sup>-1</sup> przy rozdzielczości widmowej 4 cm<sup>-1</sup>. Każdy pomiar obejmował przeciętnie 16 skanów, a poprzedzała go rejestracja widma tła. Do sterowania spektrometrem i interpretacji widm wykorzystano oprogramowanie OMNIC.

Widma Ramana rejestrowano przy pomocy spektrometru DXR RamanSmart (Thermo Fisher Scientific, Madison, USA). Spektrometr był wyposażony w filtr Rayleigha, detektor CCD i oprogramowanie OMNIC for Dispersive Raman. Widma rejestrowano w zakresie spektralnym 3413–99 cm<sup>-1</sup> przy użyciu lasera DXR o mocy 15 mW, długości fali 780 nm i szerokości szczeliny 25 µm. Czas naświetlania wynosił 1 s, a próbkę skanowano 2-krotnie.

Temperatury topnienia badanych substancji określono przy użyciu termomikroskopu Boëtiusa (Carl Zeiss, Jena, Niemcy).

### 3. Obliczenia

Wszystkie pomiary powtarzano trzykrotnie i przedstawiano jako średnią arytmetyczną. Do interpretacji wyników uzyskanych na podstawie rozkładu termicznego pochodnych puryny i soli magnezu wykorzystano PCA [Esbensen & Swarbrick, 2018]. Obliczenia przeprowadzono za pomocą oprogramowania Statistica 7.1 (StatSoft<sup>®</sup>, Tulsa, USA). Zasada obliczeń PCA polega na redukcji dużej liczby zmiennych do dwóch lub trzech pierwszych głównych składowych (*principal components*, PC's), które odzwierciedlają relacje pomiędzy badanymi próbkami na podstawie wyników ich rozkładu termicznego. W ten sposób, korzystając z redukcji wielowymiarowości w zbiorze wyników pomiarowych (macierzy), składającej się z dużej liczby próbek (wierszy) i wykonanych z ich udziałem badań (kolumny), można względnie łatwo poznać relacje pomiędzy badanymi próbkami korzystając z czytelnych, dwu lub trójwymiarowych wykresów.

Punktem wyjścia do obliczeń PCA w przypadku metyloksantyn była macierz danych X o wymiarach n × p, w której n oznacza liczbę badanych próbek (rzędy, wiersze), a p – liczbę parametrów termoanalitycznych (zmienne, kolumny). Dla badanych związków (teofilina, teobromina, kofeina, diprofilina i aminofilina) zbudowano pięć macierzy. W każdej z nich w rzędach umieszczono dane dla trzech próbek badanej substancji o różnych masach (50, 100 i

200 mg) i ogrzewanych przy czterech szybkościach ogrzewania (3, 5, 10 i 15°C/min) (12 rzędów). W kolumnach zamieszczono wyniki rozkładu termicznego badanych związków, tj. dane uzyskane na podstawie krzywych DTA –  $T_i$ ,  $T_f$ ,  $T_p$  i  $\Delta T$  dla kolejnych pików endotermicznych lub egzotermicznych, oraz krzywych TG i DTG –  $T_i$ ,  $T_f$ ,  $\Delta T$  i  $\Delta m$  dla kolejnych ubytków masy. Matryce liczyły od 12 do 22 kolumn, zależnie od badanego związku.

Macierz X poddano standaryzacji, a następnie na jej podstawie obliczono nową macierz R. W wyniku dalszych obliczeń uzyskano kolumny w macierzach P i W, które nazwano głównymi składowymi (PC). Nowa macierz P odzwierciedla główne relacje pomiędzy próbkami i umożliwia klasyfikację próbek według wpływu masy i szybkości ogrzewania na rozkład termiczny badanej metyloksantyny. Macierz W ilustruje główne relacje pomiędzy wynikami badań termoanalitycznych i umożliwia wybór kluczowych parametrów termicznych decydujących o dokonanej klasyfikacji badanych związków.

W przypadku obliczeń PCA obejmujących sole magnezu, w każdej macierzy badane związki (octan, walproinian, mleczan, cytrynian i wodoroasparginian magnezu oraz wodoroasparginian cynku) stanowiły rzędy. W kolumnach znajdowały się wyniki rozkładu termicznego tych związków, tj. T<sub>i</sub>, T<sub>p</sub> i  $\Delta T$  dla kolejnych pików endotermicznych lub egzotermicznych krzywych DTA oraz T<sub>i</sub>, T<sub>f</sub>, ΔT, Δm i T<sub>p</sub> dla ubytków masy na krzywych TG i DTG. Utworzono dziewięć macierzy, tj. dla danych uzyskanych na podstawie I etapu rozkładu (trzy macierze – dane termoanalityczne uzyskane z krzywych TG i DTG, DTA oraz połączone dane DTA, TG i DTG), II etapu rozkładu (trzy macierze) i połączonych danych dla I i II etapu rozkładu (trzy macierze). Macierze dla I etapu (dehydratacja) składały się z 4 rzędów, ponieważ etapu tego nie odnotowano w przypadku cytrynianu magnezu oraz wodoroasparginianu cynku. W odniesieniu do II etapu rozkładu macierze składały się z 6 rzędów (wszystkie badane związki). Wyniki uzyskane z krzywych TG i DTG zostały ujęte w 60 kolumnach (3 próbki, każda próbka ogrzewana przy czterech szybkościach, oraz 5 parametrów uzyskanych dla każdej ogrzewanej próbki – T<sub>i</sub>, T<sub>f</sub>, ΔT, Δm i T<sub>p</sub>). Natomiast macierze sporządzone na podstawie danych uzyskanych z krzywych DTA składały się z 48 kolumn (3 próbki, każda próbka ogrzewana przy czterech szybkościach, 4 parametry uzyskane dla każdej ogrzewanej próbki - $T_i, T_f, T_p i \Delta T$ ).

# IV. Wyniki doświadczeń i dyskusja

#### 1. Metyloksantyny

Badane metyloksantyny, teofilina, teobromina, kofeina, diprofilina i aminofilina, są pochodnymi puryny różniącymi się między sobą położeniem podstawników metylowych i ich liczbą. Podstawowe dane fizykochemiczne o badanych substancjach zestawiono w Tabeli 8, natomiast na Rys. 1 przedstawiono ich wzory strukturalne (Wesołowski & Szynkaruk, 2001). Diprofilina zawiera dodatkowo podstawnik dihydroksypropylowy, zaś aminofilina określana jest jako związek, sól lub stabilna mieszanina teofiliny i etylenodiaminy [Serajuddin, 1986; Farmakopea Polska VIII, 2008].

Lp.	Pochodne puryny	Wzór sumaryczny	Masa molowa	Temperatura topnienia °C
1.	Teofilina	$C_{5}H_{2}N_{4}O_{2}(CH_{3})_{2}$	C <sub>7</sub> H <sub>8</sub> N <sub>4</sub> O <sub>2</sub> 180,17	270–274 <sup>a</sup> (275–276)
2.	Teobromina	$C_{5}H_{2}N_{4}O_{2}(CH_{3})_{2}$	C <sub>7</sub> H <sub>8</sub> N <sub>4</sub> O <sub>2</sub> 180,17	357 <sup>b</sup> ; 290–295 <sup>b s</sup>
3.	Kofeina	C <sub>5</sub> HN <sub>4</sub> O <sub>2</sub> (CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub>	C <sub>8</sub> H <sub>10</sub> N <sub>4</sub> O <sub>2</sub> 194,19	234–239 <sup>a</sup> ; 236–238 <sup>b</sup> ; 178 <sup>b s</sup> (239)
4.	Diprofilina	C <sub>5</sub> HN <sub>4</sub> O <sub>2</sub> (CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> C <sub>3</sub> H <sub>5</sub> (OH) <sub>2</sub>	C <sub>10</sub> H <sub>14</sub> N <sub>4</sub> O <sub>4</sub> 254,25	160–165 <sup>a</sup> (160–161)
5.	Aminofilina	2C <sub>5</sub> H <sub>2</sub> N <sub>4</sub> O <sub>2</sub> (CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ,C <sub>2</sub> H <sub>8</sub> N <sub>2</sub> 2H <sub>2</sub> O	$\begin{array}{c} C_{16}H_{28}N_{10}O_6\\ 456,44\end{array}$	270–274 <sup>a</sup> (274–275)

Tabela 8 Wzory chemiczne, masy molowe i temperatury topnienia pochodnych puryny. (w nawiasach podano temperatury topnienia wyznaczone w tej pracy)

<sup>a</sup> European Pharmacopoeia, wyd. III, Council of Europe, Strasburg Cedet 1997; <sup>b</sup> The dictionary of substances and their effects, The Rogal Society of Chemistry, London 1994; <sup>s</sup> Temperatura sublimacji

Krzywe DSC metyloksantyn pokazano na Rys. 2, natomiast wyniki ich interpretacji zestawiono w Tabeli 9 (Wesołowski & Szynkaruk, 2008). Wskazują one na podobny przebieg rozkładu termicznego badanych substancji. Przy szybkości ogrzewania 10°C/min, temperatura topnienia wynosi od 156,52°C dla diprofiliny do 348,92°C dla teobrominy, natomiast ciepła topnienia, od 22,81 kJ/mol dla teofiliny do 57,42 kJ/mol dla teobrominy. Z analizy kształtu krzywych DSC wynika ponadto, że z wyjątkiem aminofiliny, pozostałe związki nie zawierają wody krystalizacyjnej. Teofilina, teobromina i kofeina ulegają rozkładowi podczas topnienia, zaś diprofilina po stopieniu jest stosunkowo trwała i odparowuje wraz z rozkładem w wyższej temperaturze. W przypadku kofeiny, niewielki, endotermiczny pik DSC w temp. 144°C może wskazywać na przemianę polimorficzną. Według danych literaturowych, forma beta kofeiny,

która jest stabilna w niskiej temperaturze przekształca się w temp. 141±2°C w wysokotemperaturową formę alfa kofeiny [Bothe & Cammenga, 1979].



Rys. 1 Wzory strukturalne badanych metyloksantyn: teofilina (a), teobromina (b), kofeina (c), diprofilina (d), aminofilina (e).



Rys. 2 Krzywe DSC: teofiliny (a), teobrominy (b), kofeiny (c), diprofiliny (d), aminofoliny (e). 10 mg próbki badanych substancji ogrzewano z szybkością 10°C/min.

Interesująca jest również krzywa DSC aminofiliny. Ta stabilna mieszanina teofiliny i etylenodiaminy ulega dehydratacji w niższej temperaturze, a następnie odparowuje cząsteczka etylenodiaminy. Wolna teofilina topi się wraz z rozkładem w wyższych temperaturach. Przeprowadzone badania potwierdzają, że temperatury topnienia badanych metyloksantyn są zgodne z wartościami literaturowymi [Farmakopea Polska VIII, 2008; European Pharmacopoeia 5, 2005] i zmierzonymi za pomocą termomikroskopu Boetiusa.

	Pochodne	Masa próbki	Temperatura	Szerokość	Wysokość	Entalpia	topnienia
Lp.	puryny	Szybkość ogrzewania	topnienia °C	piku °C	piku mW	J/g	kJ/mol
1	Teofiling	10.10 mg 10°C/min	271,28	3,61	62,88	159,92	22,81
1.	Teomina	9.75 mg 20°C/min	272,74	5,21	96,87	190,87	34,39
2	Teobromina	9.75 mg 10°C/min	348,92	4,81	73,79	318,70	57,42
2.	1 coor onnina	10.15 mg 20°C/min	349,88	6,45	10,29	213,75	38,51
2	Vofeine	11.15 mg 10°C/min	235,84	2,90	65,36	118,36	22,98
Э.	Kolenia	9.80 mg 20°C/min	237,60	4,14	77,09	107,89	20,95
1	Diprofiling	11.75 mg 10°C/min	156,52	4,61	39,35	165,29	42,02
4.	4. Diprofilina	9.60 mg 20°C/min	157,37	5,84	51,75	142,72	36,29
5	Aminofiling	10.40 mg 10°C/min	271,28	2,81	69,37	141,85	25,56
5.	Anninomina	10.10 mg 20°C/min	272,54	3,81	95,04	151,49	27,29

Tabela 9 Wyniki interpretacji krzywych DSC analizowanych związków.

Do badania rozkładu termicznego metyloksantyn włączono również pozostałe metody analizy termicznej, tj. DTA, TG i DTG. Krzywe rozkładu termicznego wszystkich badanych związków przedstawiono na Rys. 3 i 4, natomiast wyniki analiz dla skrajnych wartości odważek i szybkości ogrzewania zestawiono w Tabeli 10. Jak wynika z tych danych, rozkład termiczny teofiliny, teobrominy i aminofiliny można opisać jako proces dwuetapowy, a kofeiny i diprofiliny jako trójetapowy. Etap I obejmuje zakres temperatur, w którym nie zachodzą żadne procesy związane ze zmianą struktury chemicznej badanego związku, co uwidacznia się na krzywych TG i DTG w postaci braku ubytku masy. Występujące na tym etapie wysokie, wąskie i ostro zakończone endotermiczne piki DTA odzwierciedlają przemiany fazowe, takie jak przemiana polimorficzna kofeiny lub topnienie diprofiliny. Wzrost temperatury powoduje transformację związku z jednej formy krystalicznej do drugiej (przemiana polimorficzna), albo z jednego stanu skupienia do drugiego (topnienie, sublimacja).



Rys. 3 Krzywe DTA, TG i DTG rozkładu termicznego: teofiliny (a), teobrominy (b), kofeiny (c). 100 mg próbki badanych substancji ogrzewano z szybkością 5°C/min.



Rys. 4 Krzywe DTA, TG i DTG rozkładu termicznego: diprofiliny (d), aminofiliny (e). 100 mg próbki badanych substancji ogrzewano z szybkością 5°C/min.

Pomimo, iż podczas topnienia nie dochodzi do ubytku masy, bardzo często odnotowuje się niewielki ubytek masy związany z parowaniem stopionej substancji. W tej sytuacji, na krzywej DTA występuje drugi, niższy i szerszy pik endotermiczny odzwierciedlający ciepło parowania, któremu często towarzyszy rozkład stopionego związku. Rozpoczyna on etap II

rozkładu, determinowany chemiczną strukturą badanych związków. Tworzy się jeden lub kilka pośrednich produktów rozkładu. Zakresy temperatur odpowiadające tworzeniu się, a następnie rozkładowi pośrednich produktów nie są wyraźnie zaznaczone na krzywych DTA, TG i DTG, co może być spowodowane równoległym przebiegiem wielu reakcji chemicznych. Efekty termiczne związane z tymi reakcjami (ubytki masy, piki endo- lub egzotermiczne) nakładają się na siebie. Zaobserwowano również, że w wąskim zakresie temperatur etapu II obserwowany jest ponad 90% ubytek masy. Wysoka temperatura, w której kończy się ten etap powoduje zwęglenie pozostałości po rozkładzie.

			Etap rozkładu						
Lp.	Pochodne puryny	Masa próbki Szybkość ogrzewania	Zakres tem Zakres temp. o	p. piku DTA, ΔT (°C); temp. piku D etapu rozkładu, ΔT (°C); temp. piku ubytek masy TG, Δm (%)	TA, Tp (°C) DTG, Tp (°C);				
			Ι	II	III				
1	Teofilina	50 mg 3°C/min		250-270, 260 <sup><i>a</i></sup> ;270-345, 315 <sup><i>a</i></sup> ; 345-390, 360 <sup><i>a</i></sup> 195-520, 330; 100%	570-805, 630 <sup>a</sup>				
1.	Teomina	200 mg 15°C/min		245-330, 255 <sup><i>a</i></sup> ; 330-485, 415 <sup><i>a</i></sup> ; 485-570, 495 <sup><i>a</i></sup> 195-665, 410; 100%	570-805, 630 <sup>a</sup>				
2	Tachnomina	50 mg 3°C/min		300-335, 310 <sup><i>a</i></sup> ; 335-365, 360 <sup><i>a</i></sup> 195-395, 325; 100%	435-525, 475 <sup>a</sup>				
2.	Teobromina	200 mg 15°C/min		315-425, 385 <sup><i>a</i></sup> ; 425-545, 465 <sup><i>a</i></sup> 215-550, 395; 100%	545-735, 610 <sup>a</sup>				
3	Kofeina	50 mg 3°C/min	130-160, 150 <sup><i>a</i></sup>	225-300, 285 <sup><i>a</i></sup> 140-325, 290; 100%	415-480, 455 <sup><i>a</i></sup>				
5.	Kolellia	200 mg 15°C/min	115-175, 145 <sup>a</sup>	205-420, 345 <sup><i>a</i></sup> 145-485, 365; 100%	420-730, 550 <sup>a</sup>				
4	Diprofilina	50 mg 3°C/min	110-150, 130 <sup><i>a</i></sup>	345-380, 365 <sup><i>a</i></sup> 180-510, 340; 100%	380-515, 495 <sup>b</sup>				
т.	Dipromina	200 mg 15°C/min	105-210, 140 <sup><i>a</i></sup>	310-510, 480 <sup><i>a</i></sup> 210-770, 440; 100%	510-800, 570 <sup>b</sup>				
5	Aminofiling	50 mg 3°C/min		65-135, 95 <sup>a</sup> ; 245-265, 225 <sup>a</sup> ; 330-380, 360 <sup>a</sup> 70-130, 105; 19%; 190-370, 320; 81%	405-505, 455 <sup>a</sup>				
Э.	Aminoiiiina	200 mg 15°C/min		60-235, 115 <sup><i>a</i></sup> ; 235-320, 260 <sup><i>a</i></sup> ; 320-550, 460 <sup><i>a</i></sup> 60-210, 145; 17,5%; 230-525, 415; 82,5%	560-710, 630 <sup>a</sup>				

Tabela 10 W	vniki analizy	/ krzvwv	ch DTA	TG i DTG rozkładu	termicznego	badanych	zwiazków
	ymini ananz y	/ IXI Z Y VV Y	on Diri,	101D1010LKiddu	termeznego	ouduniyon	ZWIGZKOW

Pik: <sup>a</sup> endotermiczny, <sup>b</sup> egzotermiczny

Warunki analizy		50 mg, 2	3°C/min			50 mg,	5°C/min			50 mg, 1	0°C/min			50 mg, 1	5°C/min	
Związek	$T_i$	T <sub>f</sub>	$\Delta T$	T <sub>p</sub>	T <sub>i</sub>	$T_{\rm f}$	ΔΤ	T <sub>p</sub>	T <sub>i</sub>	T <sub>f</sub>	ΔΤ	T <sub>p</sub>	T <sub>i</sub>	T <sub>f</sub>	ΔΤ	T <sub>p</sub>
Teofilina	195	520	325	330	185	565	380	375	160	540	380	355	195	600	405	390
Teobromina	195	395	200	325	215	440	225	355	215	460	245	365	210	495	285	380
Kofeina	140	325	185	290	125	340	215	275	135	355	220	300	145	410	265	325
Diprofilina	180	510	330	340	205	545	340	380	210	585	375	395	220	605	385	410
Aminofilina	70	370	300	320	50	390	340	330	65	430	365	355	60	470	410	370
Warunki analizy		100 mg,	3°C/min			100 mg,	5°C/min			100 mg,	10°C/min			100 mg,	15°C/min	
Związek	$T_i$	T <sub>f</sub>	$\Delta T$	T <sub>p</sub>	T <sub>i</sub>	$T_{\rm f}$	ΔΤ	T <sub>p</sub>	$T_i$	T <sub>f</sub>	$\Delta T$	T <sub>p</sub>	T <sub>i</sub>	T <sub>f</sub>	ΔΤ	T <sub>p</sub>
Teofilina	190	415	225	370	175	555	380	360	190	590	400	390	190	605	415	395
Teobromina	205	415	210	340	200	420	220	355	200	475	275	360	210	530	320	385
Kofeina	150	365	215	320	145	350	205	305	140	410	270	330	145	410	265	345
Diprofilina	185	545	360	390	190	560	370	385	205	620	415	415	225	670	445	430
Aminofilina	65	390	325	345	75	430	355	360	60	470	410	390	70	505	435	405
Warunki analizy		200 mg,	3°C/min			200 mg,	5°C/min			200 mg,	10°C/min			200 mg,	15°C/min	
Związek	$T_i$	T <sub>f</sub>	$\Delta T$	$T_p$	$T_i$	$T_{\mathrm{f}}$	ΔΤ	T <sub>p</sub>	$T_i$	$T_{\rm f}$	$\Delta T$	T <sub>p</sub>	Ti	$T_{\rm f}$	ΔΤ	T <sub>p</sub>
Teofilina	190	550	360	370	200	595	395	390	195	645	450	415	195	665	470	410
Teobromina	215	440	225	365	210	480	270	375	215	550	335	380	215	550	335	395
Kofeina	150	355	205	300	155	370	215	310	145	410	265	335	145	485	340	365
Diprofilina	165	530	365	360	200	635	445	420	245	650	405	435	210	770	560	440
Aminofilina	65	430	365	360	75	470	395	380	70	510	440	410	60	525	465	415

Tabela 11 Wyniki rozkładu termicznego pochodnych puryny uzyskane dla odważek o masie 50, 100 i 200 mg ogrzewanych z szybkością 3, 5, 10 i 15 °C/min.



Rys. 5 Krzywe DTA, TG i DTG rozkładu termicznego teofiliny rejestrowane przy szybkości ogrzewania 5°C/min dla odważek: 50 mg (a), 100 mg (b) i 200 mg (c).



Rys. 6 Krzywe DTA, TG i DTG rozkładu termicznego aminofiliny rejestrowane dla odważek o masie 100 mg z szybkością: 3°C/min (a), 5°C/min (b), 10°C/min (c) i 15°C/min (d).

W etapie III, w wyniku dalszego wzrostu temperatury, zwęglona pozostałość ulega ostatecznej destrukcji połączonej z jej całkowitym spaleniem. Stwierdzono brak jakiejkolwiek pozostałości w tyglu po zakończeniu analizy.

Reakcje rozkładu przebiegające w substancjach w stanie stałym mają bardzo często przebieg wieloetapowy [Galwey, 2007; Lizarraga et al., 2007; Ramos & Cavalheiro, 2007]. Rozkład tego samego związku może zachodzić w różny sposób, zależnie od właściwości badanej próbki, jej masy, wielkości ziaren, przewodności cieplnej, stopnia krystaliczności i rozcieńczenia przez substancję obojętną, a także w zależności od warunków prowadzenia badań, takich jak szybkość ogrzewania próbki lub atmosfera gazowa. W celu oceny wpływu masy próbek i szybkości ogrzewania na rozkład termiczny metyloksantyn, próbki o masie 50, 100 i 200 mg ogrzewano z szybkością 3, 5, 10 i 15°C/min. Uzyskane wyniki zestawiono w Tabeli 11 oraz przedstawiono graficznie na Rys. 5 i 6.

Analizując wpływ masy próbki na wyniki rozkładu termicznego stwierdzono, że wraz ze wzrostem masy próbki przy jednoczesnym zachowaniu tej samej szybkości ogrzewania, następuje zmiana kształtu krzywych DTA, TG i DTG. Wysokość pików i ich powierzchnia zwiększają się proporcjonalnie do ilości ciepła wymienianego przez próbkę z otoczeniem. Jednocześnie obserwuje się nieznaczne przesunięcie temperatury piku i jego końca w kierunku wyższych wartości. Zilustrowano to graficznie na Rys. 5, na przykładzie teofiliny.

		Wymiary macierzy n × p	Główne składowe								
	Pochodne puryny		PC1		PC2		PC3				
Lp.			Wariancja %	Wartości własne	Wariancja (skumulowana wariancja) %	Wartości własne	Wariancja (skumulowana wariancja) %	Wartości własne			
1.	Teofilina	12 × 12	64,0	7,7	21,9 (85,9)	2,6	5,0 (90,9)	0,6			
2.	Teobromina	12 × 17	66,7	11,3	14,1 (80,8)	2,4	8,9 (89,7)	1,5			
3.	Kofeina	$12 \times 17$	60,2	10,2	26,7 (86,9)	4,5	5,9 (92,8)	1,0			
4.	Diprofilina	$12 \times 20$	70,0	14,0	17,2 (87,2)	3,4	4,5 (91,7)	0,9			
5.	Aminofilina	12 × 22	70,2	15,4	15,4 (85,6)	3,4	5,0 (90,6)	1,1			

Tabela 12 Wyniki obliczeń PCA na podstawie danych otrzymanych z krzywych DTA, TG i DTG.

Oceniając wpływ szybkości ogrzewania na kształt krzywych DTA, TG i DTG rozkładu termicznego stwierdzono, że wpływa ona w istotny sposób na zakresy temperatur kolejnych etapów rozkładu. Wraz ze wzrostem szybkości ogrzewania, zakresy temperatur i temperatury pików ulegają przesunięciu w kierunku wyższych wartości. Z drugiej strony, w przypadku krzywych wykreślanych w funkcji temperatury piki są wyższe i szersze, zaś krzywe TG stają się bardziej płaskie. Zilustrowano to graficznie na Rys. 6, na przykładzie aminofiliny. Gdy krzywe wykreśla się w funkcji czasu, piki na krzywych DTA i DTG stają się węższe, a kąt nachylenia krzywej TG bardziej ostry. Zmiany te wynikają ze wzrostu stopnia przereagowania substancji w krótszym przedziale czasu oraz z różnicy temperatur między powierzchnią a wnętrzem próbki, która rośnie wraz ze wzrostem szybkości ogrzewania.

Pełna ocena wpływu masy próbki i szybkości ogrzewania na rozkład metyloksantyn wymaga zastosowania analizy głównych składowych (PCA). Jest to nienadzorowana metoda wielowymiarowej analizy statystycznej, oparta na redukcji wielowymiarowości [Esbensen & Swarbrick, 2018]. Interpretacja zestawionych w Tabeli 12 wyników obliczeń wykazała, że dwie pierwsze główne składowe (PC1 i PC2) wyjaśniają łącznie ponad 80% zmienności, a ich wartości własne są większe niż 2. Umożliwia to badanie relacji pomiędzy wielkością odważki a szybkością ogrzewania dla każdego związku w układzie dwuwymiarowym utworzonym przez dwie pierwsze główne składowe, PC1 i PC2.



Rys. 7 Wykres dwóch pierwszych głównych składowych (PC1 i PC2), wyznaczony na podstawie wyników rozkładu teofiliny (różne odważki i szybkości ogrzewania).

Graficzną interpretację obliczeń PCA na przykładzie teofiliny przedstawiono na Rys. 7. Wykres punktowy wyraźnie odzwierciedla różnice w warunkach doświadczalnych, w których prowadzono analizę termiczną. Po lewej stronie wykresu znajdują się próbki teofiliny o masie 50, 100 i 200 mg ogrzewane przy małej szybkości ogrzewania, tj. 3°C/min. Po przeciwnej, tj. prawej stronie wykresu, znajdują się próbki teofiliny o masie 50, 100 i 200 mg ogrzewane przy dużej szybkości ogrzewania, 15°C/min. W efekcie można stwierdzić, że na wyniki rozkładu wpływa przede wszystkim szybkość ogrzewania. Badając wpływ masy próbki przy stałej szybkości ogrzewania ustalono, że masa próbki przy szybkości ogrzewania 3°C/min wpływa na wynik rozkładu termicznego teofiliny w mniejszym stopniu, niż prędkość wynosząca 15°C/min. Analiza ładunków własnych głównych składowych wykazała, iż na rozmieszczenie badanych próbek na wykresie PC1 i PC2, w najmniejszym stopniu wpływa temperatura topnienia i temperatura przemiany polimorficznej badanych związków.



Rys. 8 Wykres dwóch pierwszych głównych składowych (PC1 i PC2), wyznaczony na podstawie wyników rozkładu aminofiliny (różne odważki i szybkości ogrzewania).

Na Rys. 8 przedstawiono kolejny przykład potwierdzający powyższe obserwacje. Podobnie, jak w przypadku teofiliny, po lewej stronie wykresu znajdują się próbki aminofiliny o masie 50, 100 i 200 mg ogrzewane przy małej szybkości wzrostu temperatury, 3°C/min, zaś po prawej stronie – te same próbki ogrzewane z szybkością wzrostu temperatury 15°C/min. Na podstawie tych danych można stwierdzić, że optymalne warunki badania rozkładu termicznego metyloksantyn można uzyskać stosując masy próbek i szybkości ogrzewania znajdujące się w centralnej części wykresu, tj. ogrzewając próbki o masie 100 mg z szybkością 10°C/min oraz o masie 200 mg z szybkością 5°C/min.

### 2. Związki magnezu

Wzory strukturalne i podstawowe dane opisujące badane związki magnezu zestawiono w Tabeli 13 (Szynkaruk et al., 2010). Wynika z nich, iż octan i walproinian magnezu są solami jednokarboksylowych, alifatycznych kwasów organicznych, mleczan i cytrynian magnezu to z kolei alifatyczne hydroksykwasy zawierające po jednej grupie –OH. Bardziej złożoną strukturę przedstawiają sole magnezu i cynku kwasu asparaginowego, aminokwasu zawierającego dwie grupy –COOH. Badając sól cynku zamierzano określić wpływ kationu

(Mg<sup>2+</sup> i Zn<sup>2+</sup>) na rozkład podstawowej struktury tego aminokwasu. W piśmiennictwie nie znaleziono danych na temat rozkładu termicznego badanych związków. Wyjątkiem jest octan magnezu, jego dehydratacja rozpoczyna się w temp. 80°C, a następnie bezwodna sól rozkłada się w temp. 323°C [Poradnik Fizykochemiczny, 1974].

Zestawione w Tabeli 14 wyniki analiz krzywych DTA, TG i DTG wskazują, że rozkład termiczny większości badanych związków zachodzi w dwóch etapach. W etapie I, obejmującym zakres temperatur od 35 do 225°C następuje dehydratacja. Potwierdza to ubytek masy na krzywych TG i DTG dla czterech soli magnezu: octanu, walproinianu, mleczanu i wodoroasparaginianu. Piki na krzywych DTA także potwierdzają dehydratację.

Badane związki różnią się liczbą cząsteczek wody krystalizacyjnej. Analiza krzywych DTA, TG i DTG przedstawionych na Rys. 9–10 wykazała, że w przypadku walproinianu i wodoroasparaginianu magnezu dehydratacja zachodzi w jednym etapie. W przeciwieństwie do tych związków, dehydratacja octanu i mleczanu magnezu jest procesem składającym się odpowiednio, z trzech i dwóch podetapów. Świadczy o tym przede wszystkim kształt pików na krzywych DTA i DTG.

Bardzo pomocna w badaniu dehydratacji okazała się technika DSC. Interpretacja krzywych DSC zilustrowanych na Rys. 11 oraz danych dla dwóch szybkości ogrzewania zestawionych w Tabeli 15 wykazała, że temperatury dehydratacji ulegają nieznacznemu przesunięciu w kierunku wyższych wartości ze wzrostem szybkości ogrzewania. Entalpia dehydratacji przyjmuje natomiast różne wartości dla kolejnych podetapów tego procesu. Najmniejsza ilość ciepła jest potrzebna do uwolnienia, odpowiednio, dwóch moli wody krystalizacyjnej z octanu magnezu i mola wody z walproinianu magnezu. O wiele więcej ciepła potrzeba do uwolnienia trzech i czterech moli wody krystalizacyjnej, odpowiednio z mleczanu i wodoroasparaginianu magnezu.

Analiza kształtu krzywych DSC potwierdziła, iż z wyjątkiem wodoroasparaginianu magnezu (Rys. 11E), w każdym przypadku dehydratacja przebiega w kilku podetapach. Octan magnezu uwalnia cztery mole wody krystalizacyjnej w trzech podetapach (Rys. 11A), co w połączeniu z analizą TG i DTG pozwala przyjąć, że woda krystalizacyjna uwalniana jest w następującej sekwencji: jeden mol, jeden mol, dwa mole. Na krzywych DSC walproinianu (Rys. 11B) i mleczanu (Rys. 11C) magnezu widoczne są dwa nakładające się na siebie piki endotermiczne. Wskazuje to, iż dehydratacja zachodzi w dwóch podetapach, ale analiza TG i DTG umożliwia identyfikację dwóch podetapów tylko w przypadku mleczanu magnezu.

			/		Zawart	ość/% <sup>a</sup>	
Lp.	Badane związki	Wzór strukturalny	Wzór sumaryczny Masa molowa	Woda krystaliczna		Tlenek magnezu	
				obl.	ozn.	obl.	ozn.
1.	Octan magnezu	$\left[ H_{3}C - COO^{-} \right]_{2} Mg^{2+} + 4 H_{2}O$	C <sub>4</sub> H <sub>14</sub> O <sub>8</sub> Mg 214.45	33,6	33,0	18,8	19,0
2.	Walproinian magnezu	$\begin{bmatrix} H_{3}C-CH_{2}-CH_{2}-CH_{2}-CH_{2}-COO^{-}\\ H_{2}C-CH_{2}-CH_{3} \end{bmatrix}_{2}^{Mg^{2+}} H_{2}O$	C <sub>16</sub> H <sub>32</sub> O <sub>5</sub> Mg 328.73	5,5	4,5	12,3	13,0
3.	Mleczan magnezu	$\begin{bmatrix} H_3C - CH - COO^- \\ I \\ OH \end{bmatrix}_2 Mg^{2+} \star 3 H_2O$	C <sub>6</sub> H <sub>16</sub> O <sub>9</sub> Mg 256.49	21,1	19,5	15,7	16,0
4.	Cytrynian magnezu	$\begin{bmatrix} H_{2}C - COO^{-} \\ HO - C - COO^{-} \\ H_{2}C - COO^{-} \end{bmatrix}_{2}^{*} 3 Mg^{2*}$	C <sub>12</sub> H <sub>10</sub> O <sub>14</sub> Mg <sub>3</sub> 451.11	-	_	26,8	26,5
5.	Wodoroasparaginian magnezu	$ \begin{bmatrix} HOOC - CH_2 - CH - COO^{-} \\ NH_2 \end{bmatrix}_2^{Mg^{2+}} 4 H_2O $	C <sub>8</sub> H <sub>20</sub> O <sub>12</sub> N <sub>2</sub> Mg 360.56	20,0	20,5	11,2	12,0
6.	Wodoroasparaginian cynku	$\begin{bmatrix} HOOC - CH_2 - CH - COO^{-} \\ NH_2 \end{bmatrix}_2^{2^+}$	$C_8H_{12}O_8N_2Zn$ 329.58	_	_	24,7 <sup>b</sup>	25,0

Tabela 13 Ogólna charakterystyka badanych soli kwasów organicznych.

<sup>a</sup> Zawartość wody krystalizacyjnej i pozostałość po rozkładzie wyznaczono na podstawie krzywych TG i DTG dla próbek o masie 100 mg ogrzewanych z szybkością 5°C/min <sup>b</sup> Pozostałością po rozkładzie termicznym wodoroasparaginianu cynku był tlenek cynku

				Etap rozkładu					
Lp.	Badane związki	Masa próbki Szybkość ogrzewania	Zakres temperatur piku DTA, $\Delta T/^{\circ}C$ ; temperatura piku DTA, $\Delta T/^{\circ}C$ Zakres temperatur etapu rozkładu, $\Delta T/^{\circ}C$ ; temperatura piku DTG, $\Delta T/^{\circ}C$ ; ubytek masy TG, $\Delta m/^{\circ}$						
			Ι	II					
1	Ostan magnazu	50 mg 3°C/min	40-160, 85 ° 35-145, 90 (36,0)	240-370, 260 <sup>b</sup> 245-340, 280 (44,0)					
1.	Octan magnezu	200 mg 15°C/min	45-255, 115 <sup>a</sup> 50-220, 110 (34,0)	285-530, 425 ° 265-425, 320 (44,5)					
2	Walproinian	50 mg 3°C/min	65-130, 105 <sup>a</sup> 70-130, 110 (5,5)	195-445, 360 <sup>b</sup> 130-380, 365 (76,0); 380-430, 385 (6,5)					
2.	magnezu	200 mg 15°C/min	95-235, 160 <sup>a</sup> 90-190, 150 (5,0)	260-680, 580 <sup>b</sup> 190-555, 510 (80,0); 555-635, 590 (3,0)					
2	Misser	50 mg 3°C/min	65-155, 105 <sup>a</sup> 60-120, 110 (16,0); 120-150, 130 (5,0)	245-450, 310 <sup>b</sup> 250-330, 310 (31,5); 330-450, 380 (31,0)					
3.	Mieczan magnezu	200 mg 15°C/min	90-240, 150 <sup>a</sup> 60-155, 145 (16,5); 155-195, 160 (5,0)	280-640, 430 <sup>b</sup> 250-390, 370 (29,5); 390-630, 410 (33,0)					
4	Catamian magnatu	50 mg 3°C/min		60-245, 160 <sup>a</sup> ; 245-440, 320 <sup>a</sup> ; 450-510, 475 <sup>b</sup> 45-210, 100 (10,5); 210-385, 320 (14,0); 380-500, 455 (49,0)					
4.	Cytryman magnezu	200 mg 15°C/min		60-265, 180 <sup>a</sup> ; 265-355, 330 <sup>a</sup> ; 355-820, 540 <sup>b</sup> 50-255, 165 (10,0); 255-385, 320 (13,5); 385-755, 460 (50,0)					
5	Wodorosaparaginian	50 mg 3°C/min	100-200, 150 <sup>a</sup> 120-200, 155 (20,5)	200-295, 220 <sup>a</sup> ; 295-375, 300 <sup>b</sup> ; 400-510, 480 <sup>b</sup> 200-275, 215 (15,0); 275-375, 340 (14,5); 375-500, 485 (38,5)					
Э.	magnezu	200 mg 15°C/min	130-245, 195 <sup>a</sup> 130-225, 185 (20,0)	245-365, 260 <sup>a</sup> ; 365-425, 405 <sup>b</sup> ; 450-860, 630 <sup>b</sup> 225-330, 245 (16,0); 330-440, 390 (19,0); 440-890, 520 (34,0)					
6	Wodoroasparaginian	50 mg 3°C/min	60-130, 85 (1,0)	140-265, 125 <sup>a</sup> ; 265-445, 435 <sup>b</sup> 130-250, 170 (20,5); 250-370, 340 (29,5); 370-450, 430 (24,5)					
0.	cynku	200 mg 15°C/min	110-160, 155 (0,5)	160-380, 240 <sup>a</sup> ; 380-660, 470 <sup>b</sup> 160-280, 195 (19,0); 280-420, 395 (31,0); 420-660, 465 (25,0)					

Tabela 14 Wyniki analizy krzywych DTA, TG i DTG rozkładu termicznego badanych soli.

Pik: <sup>a</sup> endotermiczny, <sup>b</sup> egzotermiczny



Rys. 9 Krzywe DTA, TG i DTG rozkładu termicznego: octanu magnezu (a), walproinianu magnezu (b), mleczanu magnezu (c). 100 mg próbki badanych substancji ogrzewano z szybkością 5°C/min.



Rys. 10 Krzywe DTA, TG i DTG rozkładu termicznego: cytrynianu magnezu (a), wodoroasparaginianu magnezu (b), wodoroasparaginianu cynku (c). 100 mg próbki badanych substancji ogrzewano z szybkością 5°C/min.

In	Padana zwiazki	Masa próbki	Temperatura	Początek	Koniec dehydratacji	Entalpia d	Entalpia dehydratacji	
Lp.	Dadane związki	ogrzewania	°C	°C	°C	J/g	kJ/mol	
		10.41 mg	75,84	69,31	83,23	187,38	3,38	
		10,41 mg	116,81	114,20	118,91	41,86	0,75	
1	Ooton magnazu		161,29	155,59	177,40	578,80	20,85	
1.	Octan magnezu	10.45 mg	75,64	69,87	84,11	175,08	3,15	
		10,43  mig	116,49	114,95	119,70	18,90	0,34	
		20 C/IIIII	156,00	152,54	175,53	581,14	20,94	
2	Walproinian	10,08 mg 10°C/min	154,67	136,00	166,44	233,54	4,21	
۷.	magnezu	10,24 mg 20°C/min	162,59	143,03	190,21	223,37	4,02	
2	Mlaazan magnazu	10,32 mg 10°C/min	157,69	131,74	172,69	572,58	30,95	
Э.	3. Mieczan magnezu	10,35 mg 20°C/min	165,90	143,21	198,22	574,21	31,03	
1	Wodoroasparaginian	10,40 mg 10°C/min	176,23	163,45	202,34	602,31	43,40	
4.	magnezu	10,27 mg 20°C/min	180,75	164,82	214,24	600,80	43,29	

Tabela 15 Wyniki interpretacji krzywych DSC hydratów badanych soli magnezu.



Rys. 11 Krzywe DSC: octanu magnezu (a), walproinianu magnezu (b), mleczanu magnezu (c), cytrynianu magnezu (d), wodoroasparaginianu magnezu (e), wodoroasparaginianu cynku (f). 10 mg próbki badanych substancji ogrzewano z szybkością 10°C/min.

Bezwodne związki ulegają całkowitej destrukcji termicznej w etapie II rozkładu (Rys. 9 i 10). O wielokierunkowym przebiegu rozkładu struktury organicznej świadczy kształt krzywych TG i DTG (kilka podetapów). Nie jest jednak możliwe rozdzielenie kolejnych podetapów i identyfikacja tworzących się w tych warunkach produktów pośrednich. Ulegają one ostatecznej destrukcji połączonej z całkowitym spaleniem skoksowanej pozostałości z utworzeniem tlenku magnezu lub tlenku cynku jako produktu końcowego. Sumaryczny efekt cieplny tego etapu jest egzotermiczny, co potwierdza rozległy pik na krzywej DTA. Obecność jonów Mg<sup>2+</sup> w pozostałości po rozkładzie potwierdzono za pomocą reakcji z Magnezonem (4-nitrobenzeno-azo-rezorcyną), natomiast jony Zn<sup>2+</sup> wykryto w reakcji z tetratiocyjaniano-rtęcianem(II) amonu.

Do interpretacji uzyskanych danych zastosowano PCA [Esbensen & Swarbrick, 2018]. Dwie pierwsze główne składowe (PC1 i PC2) wyjaśniały ponad 90% zmienności dla większości badanych matryc (Tabela 16). W przypadku dwóch matryc dla etapu II, PC1 i PC2 wyjaśniały łącznie 89% wariancji. Relacje między strukturą chemiczną badanych związków a wynikami analizy krzywych DTA, TG i DTG ich rozkładu termicznego przedstawiono graficznie na Rys. 12A (etap I, dehydratacja) i Rys. 12B (etap II, rozkład).

W etapie I badane sole ulegają dehydratacji, której towarzyszy endotermiczny pik na krzywej DTA oraz kilku lub kilkudziesięcioprocentowy ubytek masy na krzywej TG. Analiza rozmieszczenia tych soli na wykresie PC1 i PC2 wskazuje, że po lewej stronie wykresu (Rys. 12A), w podobnym zakresie wartości na osi PC1 znajdują się trzy sole: octan, walproinian i mleczan magnezu. Łączy te substancje to, że są kwasami alifatycznymi zawierającymi jedną grupę –COOH, nie posiadającymi heteroatomu. Obecność grupy –OH w cząsteczce przesuwa z kolei mleczan magnezu wzdłuż osi PC1 w kierunku wartości dodatnich.



Rys. 12 Wykresy dwóch pierwszych głównych składowych (PC1 i PC2), wyznaczone na podstawie danych otrzymanych z krzywych DTA, TG i DTG dla: A – etapu I (dehydratacja) i B – etapu II rozkładu badanych substancji.

Z rozmieszczenia związków wzdłuż osi PC2 wynika, że pewien wpływ na ich położenie ma masa molowa. Im większa masa molowa, tym dany związek magnezu znajduję się w zakresie niższych wartości na osi PC2. Dla przykładu, octan magnezu o najmniejszej masie molowej jest opisany najwyższą wartością na osi PC2 (około 1,2), podczas gdy walproinian magnezu o największej masie molowej znajduje się na osi PC2 w zakresie wartości ujemnych (około –1,3).

Czwarty związek zawierający wodę krystalizacyjną, wodoroasparaginian magnezu, różni się od pozostałych soli tym, że posiada grupę –NH<sub>2</sub> i dwie grupy –COOH. Ta istotna różnica sprawia, że na wykresie PC1 i PC2 związek ten znajduje się po stronie prawej, odwrotnie niż pozostałe hydraty, w zakresie dodatnich wartości na osi PC1. W przypadku związków bezwodnych, w etapie II rozkładu tworzy się pozostałość, którą jest tlenek danego kationu (Mg<sup>2+</sup> lub Zn<sup>2+</sup>). Rozkładowi towarzyszy kilkudziesięcioprocentowy ubytek masy i wysoki egzotermiczny pik DTA. Obliczenia PCA dla sześciu badanych soli w oparciu o dane uzyskane na podstawie krzywych DTA, TG i DTG dla tego etapu rozkładu przedstawiono graficznie na Rys. 12B.

Uzyskane dane wskazują, że podobnie jak w przypadku obliczeń PCA dla etapu I, te same trzy związki: octan, walproinian i mleczan magnezu znajdują się w zbliżonym zakresie wartości PC1 i PC2 (Rys. 12A). Pozostałe substancje (cytrynian i wodoroasparaginian magnezu oraz wodoroasparaginian cynku) zlokalizowane są w różnych miejscach wykresu. Można to wyjaśnić brakiem podobieństwa ich struktury chemicznej. Cytrynian magnezu jest kwasem trikarboksylowym, podczas gdy lokalizacja soli kwasu asparaginowego wskazuje, że główny wpływ na rozkład podstawowej struktury tego kwasu ma kation metalu, z którym tworzy sól.

Obliczenia PCA wykonano także dla matryc uzyskanych poprzez połączenie danych termoanalitycznych dla etapów I i II. Jednak w tym przypadku można połączyć dwa etapy rozkładu tylko dla czterech soli (octanu, walproinianu, mleczanu i wodoroasparaginianu). Uzyskane wyniki nie wskazują innych powiązań, niż te pokazane na Rys. 12A.

			Główne składowe							
	Macierze związane	Wymiary	Pe	PC1		PC2		PC3		
Lp.	z rozkładem termicznym soli magnezu	n × p	Wariancja %	Wartości własne	Wariancja (skumulowana wariancja) %	Wartości własne	Wariancja (skumulowana wariancja) %	Wartości własne		
1.	I (DTA)	$4 \times 48$	69,8	33,5	26,4 (96,2)	12,7	3,8 (100,0)	1,8		
2.	I (TG, DTG)	$4 \times 60$	58,0	34,8	38,4 (96,4)	23,0	3,6 (100,0)	2,2		
3.	I (DTA, TG, DTG)	$4 \times 108$	62,9	67,9	33,2 (96,1)	35,8	3,9 (100,0)	4,3		
4.	II (DTA)	$6 \times 48$	79,8	38,3	15,2 (94,9)	7,3	3,0 (97,9)	1,5		
5.	II (TG, DTG)	$6 \times 60$	76,1	45,7	13,3 (89,4)	8,0	7,3 (96,7)	4,4		
6.	II (DTA, TG, DTG)	6 × 108	75,8	81,9	12,9 (88,7)	13,9	7,8 (96,5)	8,4		
7.	I and II (DTA)	4 × 96	79,0	75,8	16,3 (95,2)	15,6	4,8 (100,0)	4,6		
8.	I and II (TG, DTG)	4 × 120	66,8	80,1	29,3 (96,1)	35,2	3,9 (100,0)	4,7		
9.	I i II (DTA, TG, DTG)	4 × 216	70,8	152,8	25,0 (95,7)	53,9	4,3 (100,0)	9,3		

Tabela 16 Wyniki obliczeń PCA na podstawie danych otrzymanych z krzywych DTA, TG i DTG.

Poza solami magnezu kwasów organicznych, badaniom termoanalitycznym poddano także nieorganiczne związki magnezu stosowane jako składniki suplementów diety. Dane charakteryzujące ich właściwości termiczne zestawiono w Tabeli 17 (Wesołowski et al, 2014).

Lp.	Badane związki	Procesy termiczne [Rowe et al., 2009]	Temperatura endotermicznego piku DSC °C	Ciepło przemiany J/g
1.	Tlenek magnezu	2800°C topnienie	_	—
2.	Wodorotlenek magnezu	350°C dehydroksylacja	-	—
3.	Węglan magnezu	350°C dekarboksylacja	-	—
4.	Heksahydrat chlorku magnezu	116-118°C dehydratacja	117,49 196,66	154,38 182,06
5.	Chlorowodorek pirydoksyny	160°C topnienie z rozkładem	157,11	211,81

Tabela 17 Charakterystyka właściwości termicznych nieorganicznych związków magnezu.

Wynika z nich, że z wyjątkiem heksahydratu chlorku magnezu, wszystkie pozostałe nieorganiczne związki (tlenek, wodorotlenek, węglan) nie podlegają żadnej transformacji termicznej w badanym zakresie temperatur [Rowe et al., 2009]. Ponieważ MgO topi się w temp. 2800°C, Mg(OH)<sub>2</sub> ulega dehydroksylacji, a MgCO<sub>3</sub> dekarboksylacji w temperaturze powyżej 350°C, w zakresie temperatur od 25 do 300°C nie występują żadne piki DSC, które można użyć do wykrycia tych składników w produktach farmaceutycznych lub suplementach diety. Nie przeszkadzają więc w wykryciu organicznych substancji aktywnych, np. witaminy B<sub>6</sub>, soli organicznych magnezu, potasu i wapnia lub substancji pomocniczych, np. sacharozy, laktozy lub celulozy mikrokrystalicznej. Jedynie w przypadku heksahydratu chlorku magnezu, na krzywej DSC występuje kilka pików endotermicznych związanych ze stopniową dehydratacją tego hydratu.

### 3. Produkty zawierające metyloksantyny

W celu oceny przydatności DSC jako potencjalnej techniki umożliwiającej identyfikację składników zawartych w produktach farmaceutycznych, do badań wybrano 27 preparatów, z których większość jest dostępna bez recepty [Wesołowski et al., 2012b]. Podstawowymi aktywnymi substancjami farmaceutycznymi w tych produktach są trzy metyloksantyny: teofilina (Afonilum SR 375, Euphyllin CR, Euphyllin long 200, Euphyllin long 300, Theoplus 100 mg, Theoplus 300 mg, Theospirex retard 150 mg, Theospirex retard 300 mg, Theovent 100, Theovent 300), diprofilina (Diprophyllinum) i kofeina (Apap Extra, Aspirin Activ, Cefalgin, Coffecorn forte, Coffecorn mite, Coffepirine, Coldrex MaxGrip C, Etopiryna, Grippostad C,

Kofepar, Koferina, Kopiryna, Panadol Extra, Saridon, kapsułki Solpadeine, tabletki Solpadeine). Oprócz kofeiny, produkty zawierały także duże ilości paracetamolu, 200–500 mg (Apap Extra, Cefalgin, Coldrex Max-Grip C, Grippostad C, Kofepar, Panadol Extra, Saridon, kapsułki i tabletki Solpadeine), kwasu acetylosalicylowego, 300–500 mg (AspirinActiv, Coffepirine, Etopiryna, Koferina, Kopiryna), propyfenazonu, 150 mg (Cefalgin, Saridon), kwasu askorbinowego, 150 mg (Coldrex MaxGrip C, Grippostad C), etenzamidu, 100 mg (Etopiryna, Koferina) i mniejsze ilości fosforanu kodeiny, chlorowodorku fenylefryny i maleinianu chlorfenaminy.

Badane produkty są stosowane głównie jako leki przeciwbólowe, przeciwgorączkowe i przeciwzapalne. Ponadto, te które zawierają teofilinę i diprofilinę są także stosowane jako leki przeciwastmatyczne. Są to stałe formy leku – drażetki, klasyczne tabletki niepowlekane i powlekane, tabletki o przedłużonym działaniu i kapsułki wypełnione proszkiem oraz pastylki lub granulaty o modyfikowanym (przedłużonym) uwalnianiu. Oprócz substancji aktywnych, wszystkie badane produkty zawierały także do 11 substancji pomocniczych warunkujących odpowiednią biodostępność i stabilność leków.

W klasycznej analizie chemicznej oddzielenie analitu od substancji pomocniczych jest procesem pracochłonnym i czasochłonnym. Z kolei technika DSC umożliwia eliminację tego etapu procedury analitycznej. Producenci leków z reguły podają informacje o rodzaju substancji pomocniczych użytych do wytworzenia danego produktu. Bywa jednak, że informacja ta obejmuje wyłącznie główne substancje pomocnicze, a ponadto nie są znane proporcje, w jakiej one występują. W związku z tym, interpretując dane uzyskane za pomocą DSC należy brać pod uwagę fakt, że substancje pomocnicze mogą wpływać na wyniki analizy DSC.

## 3.1. Identyfikacja składu produktów farmaceutycznych

Wyniki analizy DSC substancji leczniczych w badanych produktach farmaceutycznych zestawiono w Tabeli 18, natomiast ich krzywe DSC przedstawiono na Rys. 13 [Wesołowski et al., 2012b]. Interpretacja tych danych wskazuje, że średnie wartości temperatur pików DSC związanych z topnieniem aktywnych składników są zgodne z podanymi w Farmakopei Polskiej VIII [Farmakopea Polska VIII, 2008], co potwierdza wysoką czystość tych substancji. Wyjątek to diprofilina i fosforan kodeiny, w przypadku których dostrzeżono niewielkie różnice między danymi uzyskanymi z DSC a wartościami podanymi w literaturze. W świetle powyższego, wysokie i wąskie piki endotermiczne substancji leczniczych mogą zostać użyte do identyfikacji tych analitów w produktach farmaceutycznych.

Lp.	Preparaty farmaceutyczne	Dawka substancji aktywnej w tabletce g	Średnia masa tabletki g	Zawartość substancji aktywnej w tabletce %	Temperatura topnienia (DSC) °C	Entalpia topnienia J/g	Współczynnik dopasowania widm FT-IR %	Współczynnik dopasowania widm Ramana %
1.	Theoplus 100	0,100	0,163	61,34	262,23	48,83	98,51	44,81
2.	Theoplus 300	0,300	0,510	58,82	261,25	42,23	98,68	46,76
3.	Theovent 100	0,100	0,181	55,24	264,12	58,76	98,15	44,55
4.	Theovent 300	0,300	0,500	60,00	270,60	77,82	98,11	44,70
5.	Theospirex retard 150	0,150	0,180	83,33	270,09	116,36	98,59	42,65
6.	Theospirex retard 300	0,300	0,359	83,56	269,80	121,23	98,79	47,13
7.	Euphyllin long 200	0,200	0,268	74,62	270,18	94,29	89,60	55,92
8.	Euphyllin long 300	0,300	0,404	74,25	272,17	103,67	98,20	52,76
9.	Euphyllin CR	0,250	0,588	42,51	143,58	63,08	92,34	51,18
10.	Afonilum SR 375	0,375	0,397	94,45	270,81	152,34	99,01	68,35
11.	Diprophyllinum	0,200	0,356	56,17	162,75	81,24	60,80	62,00
12.	Apap Extra	0,065	0,650	10,00	163,12	123,92	9,46	9,79
13.	Kofepar	0,065	0,696	9,33	163,83	131,77	13,04	3,69
14.	Panadol Extra	0,065	0,686	9,47	163,91	122,51	14,20	3,13
15.	Cefalgin	0,050	0,695	7,19	82,30	46,75	18,07	5,38
16.	Saridon	0,050	0,651	6,68	139,14	21,74	16,87	3,08
17.	Solpadeine, kapsułki	0,030	0,625	4,80	167,59	136,67	15,87	2,11
18.	Solpadeine, tabletki	0,030	0,651	4,60	166,87	123,49	7,44	4,95
19.	Grippostad C	0,025	0,395	6,32	152,58	105,67	12,64	2,57
20.	Coldrex MaxGrip C	0,025	0,743	3,36	162,79	102,32	5,02	2,88
21.	Kopiryna	0,050	0,541	9,24	132,73	121,50	2,69	9,53
22.	Coffepirine	0,050	0,548	9,12	124,97	135,45	1,03	8,63
23.	Aspirin Activ	0,050	0,647	7,72	134,07	122,61	0,37	8,31
24.	Etopiryna	0,050	0,594	8,41	76,95	-83,68	6,42	11,95
25.	Koferina	0,050	0,542	9,22	81,04	56,35	2,41	11,44
26.	Coffecorn forte	0,100	0,296	33,78	225,55	37,40	78,29	15,07
27.	Coffecorn mite	0,025	0,401	6,23	220,75	67,08	42,60	18,24

Tabela 18 Wyniki badań produktów farmaceutycznych zawierających pochodne puryny technikami DSC, FT-IR i Ramana.

Wstępna ocena krzywych DSC wskazała na duży wpływ zawartości substancji leczniczej, w przeliczeniu na jednostkę masy drażetki, tabletki lub kapsułki, w identyfikacji danego składnika w preparacie. Dane zestawione w Tabeli 18, obliczone w oparciu o dawkę substancji leczniczej i średnią masę tabletki obliczoną na podstawie 10 jednostek dawkowania wykazały, że poszczególne produkty można zróżnicować w oparciu o procentową zawartość aktywnej substancji farmaceutycznej. Wśród trzech badanych metyloksantyn, produkty zawierały w największej ilość teofilinę (42,51–4,45% masy tabletki), w mniejszej ilość diprofilinę (56,17%) i najmniej kofeiny, której zawartość mieściła się w granicach 3,36–10,00% masy tabletki.



Rys. 13 Krzywe DSC aktywnych substancji farmaceutycznych: (a) teofiliny, (b) diprofiliny, (c) kofeiny, (d) paracetamolu, (e) kwasu acetylosalicylowego, (f) kwasu askorbinowego, (g) propyfenazonu i (h) etenzamidu.

Interpretacja krzywych DSC tabletek z teofiliną wykazała, że średnia temperatura pików DSC charakteryzujących topnienie tej metyloksantyny mieści się w zakresie temperatur 269,80–272,17°C. Pik na krzywej DSC teofiliny jest zgodny z pikami endotermicznymi związanymi z topnieniem tej substancji leczniczej występującej w bardzo dużych ilościach (74,62–94,45%) w tabletkach Afonilum SR 375, Theospirex retard 300 mg i Euphyllin long 200. Potwierdza to obecność teofiliny w próbce.

Interesujące krzywe DSC zarejestrowano dla czterech produktów (Rys. 14). Widoczne są na nich dodatkowe piki związane z substancjami pomocniczymi, prawdopodobnie z dużą ilością laktozy. Krzywe te mają znacząco różny kształt w porównaniu z krzywymi pozostałych produktów z teofiliną. Ze względu jednak na dużą zawartość laktozy, są one bardzo do siebie podobne. Pik DSC związany z topnieniem teofiliny występuje na krzywych następujących

produktów: Theoplus 300, Theoplus 100 i Theovent 100. Jest on przesunięty w kierunku niższej temperatury o około 10°C i znajduje się w zakresie 261,25–264,12°C.



Rys. 14 Krzywe DSC produktów leczniczych zawierających laktozę: (a) teofilina, (b) laktoza, (c) Theoplus 300 mg, (d) Theoplus 100 mg, (e) Theovent 100 i (f) Euphyllin CR.

Szczególnym przypadkiem wśród badanych produktów farmaceutycznych są tabletki Euphyllin CR (Rys. 14, krzywa f). Mimo, iż zawierają 42,51% teofiliny, na krzywych DSC nie występuje pik potwierdzający obecność tej substancji. Jednocześnie pik pojawiający się w temperaturze około 200°C jest większy, niż podobne w przypadku pozostałych produktów. Może to dowodzić o istotnym wpływie laktozy na wyniki analizy DSC.

Badania DSC diprofiliny wykazały, że identyfikując tę substancję można posłużyć się pikiem endotermicznym znajdującym się w zakresie temperatur odpowiadających topnieniu diprofiliny (160–165°C). Na krzywej DSC tego produktu występuje także dodatkowy efekt w temp. 147,73°C, prawdopodobnie związany z substancjami pomocniczymi.

W przeciwieństwie do teofiliny i diprofiliny, obecność kofeiny nie została potwierdzona w żadnym z 16 produktów leczniczych zawierających tę substancję. Nie wystąpiły też żadne piki endotermiczne poza zakresem temperatur 234–239°C, które byłyby charakterystyczne dla tego analitu (Rys. 15). Przyczyną może być zbyt niska zawartość kofeiny w tabletkach w stosunku do ich masy, albo wpływ innych substancji leczniczych lub pomocniczych na kształt krzywych DSC. Należy także wspomnieć, że część produktów leczniczych, oprócz kofeiny zawiera także paracetamol w ilości 35,97–80,00% masy tabletki, kwas acetylosalicylowy (50,51–82,12%), kwas askorbinowy (4,04–37,94%), propyfenazon (21,58–23,04%), etenzamid (16,84–18,45%) i niewielkie ilości fosforanu kodeiny, chlorowodorku fenylefryny i maleinianu chlorfenaminy (0,63–1,28%). Z tego względu łatwiej jest zidentyfikować piki związane z topnieniem niektórych z tych substancji, niż pik topnienia metyloksantyny.



Rys. 15 Krzywe DSC produktów leczniczych zawierających kofeinę i paracetamol: (a) kofeina, (b) paracetamol, (c) Apap Extra, (d) Kofepar, (e) Panadol Extra i (f) Solpadeine (kapsułki).

Substancją, która w badanych produktach farmaceutycznych występuje w dużych ilościach jest paracetamol. Pik odzwierciedlający jego topnienie występuje w zakresie 152,58–167,59°C, niższym niż podawany w literaturze (Tabela 18). Może to być spowodowane interakcją z innymi składnikami preparatów albo z tworzeniem się eutektyku między kofeiną i paracetamolem [Tkachenko et al., 2003; Bi et al., 2003]. Wykazano także, że wszystkie produkty, które prócz kofeiny zawierają paracetamol odznaczają się specyficznym kształtem krzywych DSC (Rys. 15, krzywe c-f). Tabletki Cefalgin i Saridon zawierają identyczne stężenia substancji leczniczych (kofeiny, paracetamolu i propyfenazonu), ale są wytwarzane przez różnych producentów, a tym samym różnią się rodzajem i zawartością substancji pomocniczych (Rys. 15, krzywe d, e).



Rys. 16 Krzywe DSC produktów leczniczych zawierających kofeinę, paracetamol i propyfenazon: (a) kofeina, (b) paracetamol, (c) propyfenazon, (d) Saridon i (e) Cefalgin.

Na krzywych DSC tych preparatów widoczne są poszerzone piki o małej intensywności, trudne do interpretacji (Rys. 16). Brak także wyraźnego piku związanego z paracetamolem, który występuje w tych produktach jako główny składnik (35,97–80,00%). Nie występuje również pik endotermiczny związany z topnieniem propyfenazonu. Prawdopodobnie efekty termiczne pochodzące od substancji leczniczych i pomocniczych nakładają się na siebie, co uniemożliwia identyfikację charakterystycznych pików DSC topnienia substancji leczniczych. Z drugiej strony, dane literaturowe sugerują tworzenie eutektyków między paracetamolem i kofeiną oraz paracetamolem i propyfenazonem [Bi et al., 2003].

### 3.2. Spektroskopia w podczerwieni

Spektroskopia w podczerwieni (IR) i spektroskopia Ramana, to niedestrukcyjne techniki dostarczające cennych informacji o strukturze chemicznej związków organicznych w zakresie grup funkcyjnych i orientacji przestrzennej tych grup oraz o izomerach, a także w powiązaniu z metodami chemometrycznymi mogą być stosowane w oznaczeniach ilościowych [Szczepaniak, 2012; Sasic & Ozaki, 2010; McMahon, 2007]. Spektroskopie IR i Ramana są podobne o tyle, że w obu technikach otrzymuje się widma zmian energii oscylacyjnej i rotacyjnej w cząsteczce oraz wykorzystuje się ten sam obszar spektralny. Różnią się natomiast sposobem dokonywania pomiarów, spektroskopia IR jest metodą absorpcyjną (transmisyjną), zaś spektroskopia Ramana jest metodą rozproszeniową. Zastosowanie interferometru do otrzymywania widm IR sprawiło, że spektrometr FT-IR stał się instrumentem powszechnie wykorzystywanym w laboratoriach farmaceutycznych, odznaczającym się wysoką czułością (stosunek sygnału do szumu) oraz szybkością rejestracji widm (jednoczesny pomiar przy wszystkich długościach fal).

## 3.2.1. Analiza widm FT-IR metyloksantyn

Biorąc pod uwagę fakt, że widma FT-IR dostarczają cennych informacji pozwalających na identyfikację związków organicznych na podstawie charakterystycznych pasm absorpcji o częstościach grupowych odpowiadających poszczególnym typom drgań oscylacyjnych i rotacyjnych występujących w cząsteczkach badanych związków [Szczepaniak, 2012; Sasic & Ozaki, 2010; Silverstein et al., 2007], postanowiono sprawdzić, w jakim stopniu widma FT-IR produktów farmaceutycznych z metyloksantynami mogą zostać wykorzystane do potwierdzenia obecności substancji leczniczych w badanych produktach [Wesołowski et al., 2012b]. Z uwagi na złożoność składu chemicznego produktów farmaceutycznych można oczekiwać, że ich widma będą wypadkową absorpcji promieniowania IR przez wszystkie składniki produktu. W oparciu o to założenie zrezygnowano z przypisywania poszczególnych pasm absorpcji w

widmach FT-IR produktów leczniczych konkretnym grupom funkcyjnym metyloksantyny. Zamiast tego wykorzystano tak zwany współczynnik dopasowania, który wyrażony w procentach określa stopień, w jakim widmo danego produktu jest zgodne z widmem zawartej w nim metyloksantyny. Stanowi to podstawę do potwierdzenia obecności substancji leczniczej w badanym produkcie.



Rys. 17 Widma FT-IR: (a) teofilina i (b) Theospirex retard 300 mg.

Wygenerowane komputerowo wartości współczynników dopasowania wszystkich badanych produktów farmaceutycznych do widm odpowiednich metyloksantyn zestawiono w Tabeli 18. Wykazują one, że w przypadku teofiliny jako głównego składnika, współczynniki dopasowania widm FT-IR produktów leczniczych zawierających tę metyloksantynę mieszczą się w zakresie 89,60–99,01%. Oznacza to, że widma produktów nieomal pokrywają się z widmami teofiliny, co odzwierciedla Rys. 17. Największe podobieństwo do widma teofiliny wykazują tabletki Afonilum SR 375. Warto podkreślić, że pomimo względnie niskiej zawartości metyloksantyny w tabletkach Theoplus i Theovent (55,24–61,34%), współczynniki dopasowania widm FT-IR produktów do widma teofiliny przekraczają 98%.

Współczynnik dopasowania widma FT-IR tabletek Diprophyllinum do diprofiliny jako substancji referencyjnej wynosi 60,80% przy ilości substancji aktywnej w preparacie na poziomie 56,17%. Widma tabletek z tą metyloksantyną w dużym stopniu nakładają się na widmo diprofiliny, zaś niewielkie różnice w kształcie widm są prawdopodobnie efektem obecności substancji pomocniczych.

Zawartość kofeiny w tabletkach jest zbyt mała, by potwierdzić podobieństwo widm FT-IR tabletek do widma metyloksantyny, a wartości współczynników dopasowania są bardzo małe i obejmują zakres 0,37–18,07%. Wyjątkiem są drażetki Coffecorn forte, które przy zawartości kofeiny 33,78%, wykazują współczynnik dopasowania 78,29%, wyższy, niż w pozostałych przypadkach. Sugeruje to, że substancje pomocnicze obecne w tym preparacie nie wpływają na widmo kofeiny.

Lp.	Produkty farmaceutyczne	Zawartość paracetamolu w tabletkach %	Współczynniki dopasowania widm FT-IR %	Współczynniki dopasowania widm Ramana %
1.	Apap Extra	76,92	71,10	23,62
2.	Kofepar	71,84	67,43	22,63
3.	Panadol Extra	72,89	68,53	22,44
4.	Cefalgin	35,97	63,95	19,84
5.	Saridon	38,40	64,71	19,28
6.	Solpadeine, kapsułki	80,00	68,43	21,63
7.	Solpadeine, tabletki	76,80	67,66	22,57
8.	Grippostad C	50,63	69,43	24,29
9.	Coldrex MaxGrip C	67,29	67,26	24,50

Tabela 19 Współczynniki dopasowania widm produktów farmaceutycznych z kofeiną i paracetamolem do widm FT-IR i Ramana paracetamolu.

Tabela 20 Współczynniki dopasowania widm produktów farmaceutycznych z kofeiną i kwasem acetylosalicylowym do widm FT-IR i Ramana kwasu acetylosalicylowego.

Lp.	Produkty farmaceutyczne	Zawartość kwasu acetylosalicylowego w tabletkach %	Współczynniki dopasowania widm FT-IR %	Współczynniki dopasowania widm Ramana %
1.	Kopiryna	73,94	99,41	62,75
2.	Coffepirine	82,12	99,48	73,57
3.	Aspirin Activ	77,28	99,54	80,15
4.	Etopiryna	50,51	92,53	67,21
5.	Koferina	55,35	95,21	64,60



Rys. 18 Widma FT-IR: (a) kofeina, (b) paracetamol i (c) Panadol Extra.
Poza kofeiną, badane produkty zawierają także większe ilości paracetamolu i kwasu acetylosalicylowego, które wpływają na kształt widm. Wyniki zestawione w Tabelach 19 i 20 dla dziewięciu produktów z paracetamolem i pięciu produktów z kwasem acetylosalicylowym odzwierciedlają wysokie wartości współczynników dopasowania tych preparatów leczniczych do widm obu substancji czynnych. Mogą one być zatem pomocne w identyfikacji paracetamolu i kwasu acetylosalicylowego, co zilustrowane graficznie na Rys. 18.

#### 3.2.2. Analiza widm Ramana metyloksantyn

Spektroskopie FT-IR i Ramana są technikami komplementarnymi [Szczepaniak, 2012; Sasic & Ozaki, 2010; Johansson et al., 2002]. Charakterystyczne pasmo odpowiadające danemu rodzajowi drgań cząsteczki w widmie Ramana będzie bardzo słabo albo w ogóle nie będzie widoczne w widmie FT-IR, i na odwrót. Połączenie obu technik umożliwia jednak wiarygodną analizę struktury badanej substancji. Dla przykładu, porównanie przedstawionych na Rys. 19 widm FT-IR i Ramana teofiliny wskazuje, że nie są one identyczne, a pasma występują przy różnych liczbach falowych zależnie od zastosowanej techniki [Wesołowski et al., 2012b]. Pasma odpowiadające temu samemu typowi drgań są albo przesunięte względem siebie i różnią się intensywnością, albo nie są odzwierciedlone w widmie uzyskanym drugą techniką. Zależy to głównie do rodzaju wiązań w cząsteczce, którym odpowiadają konkretne pasma widma.



Rys. 19 Widma teofiliny: (a) FT-IR i (b) Ramana.

Duża ilość teofiliny w badanych produktach (42,65–68,35%) znajduje odzwierciedlenie we współczynnikach dopasowania, wskazujących na względnie wysoką zgodność widm Ramana produktów leczniczych z widmem metyloksantyny (Rys. 20). Porównując jednak współczynniki dopasowania uzyskane dla widm FT-IR i Ramana można stwierdzić, że w tym drugim przypadku są one mniej zadowalające (Tabela 18).



Rys. 20 Widma Ramana: (a) teofilina i (b) Theospirex retard 300 mg.

Współczynnik dopasowania widma tabletek Diprophyllinum do widma diprofiliny wynosi 62,0%, co jest porównywalne z wartością uzyskaną dla widm FT-IR. Podobnie, jak w przypadku FT-IR, niskie stężenia kofeiny w produktach farmaceutycznych odzwierciedlają niskie współczynniki dopasowania widm Ramana produktów do widma metyloksantyny (2,11–18,24%). Analiza danych zestawionych w Tabeli 19 wskazuje na niezadowalające wartości współczynników dopasowania widm Ramana produktów leczniczych do widma paracetamolu. Mieszczą się one w zakresie 19,28–24,63%, co nie ma praktycznego znaczenia z punktu widzenia identyfikacji składnika w preparacie farmaceutycznym. Odwrotnie wygląda sytuacja w przypadku kwasu acetylosalicylowego (Tabela 20).

#### 4. Produkty zawierające związki magnezu

Podobnie, jak w przypadku pochodnych puryny, celem badań było sprawdzenie przydatności DSC oraz spektroskopii FT-IR i Ramana jako technik umożliwiających wykrycie substancji leczniczych w produktach farmaceutycznych i suplementach diety [Wesołowski et al., 2014]. Podstawowymi substancjami aktywnymi badanych preparatów były sole magnezu kwasów organicznych (octan, cytrynian, diglicynian, wodoroasparaginian, mleczan, walproinian) oraz nieorganiczne związki magnezu (węglan, chlorek, wodorotlenek, tlenek). Niektóre preparaty zawierały też w różnych ilościach organiczne i nieorganiczne sole potasu (asparaginian, cytrynian, glukonian, wodoroasparaginian, wodorowęglan, chlorek) oraz wapnia (cytrynian, wodoroasparaginian, węglan). Obecne były także organiczne substancje lecznicze, takie jak chlorowodorek pirydoksyny (witamina B<sub>6</sub>), kwas asparaginowy i foliowy oraz octan tokoferylu. Jedynie 11 produktów (Asmag, Asmag forte, Asparagin, Asparaginum forte Mg + K, Asparginian extra, Bio-Magnez, Dipromal 200 mg, Dolomit VIS, Magnesol 150, Magnezin, Slow-Mag) nie zawierało witaminy B<sub>6</sub>. Spośród 30 badanych produktów, 14 to produkty lecznicze zawierające jako substancję aktywną sole magnezu kwasów organicznych (Asmag, Asmag B, Asmag forte, Aspargin, Dipromal 200 mg, Filomag B<sub>6</sub>, Laktomag B<sub>6</sub>, Maglek B<sub>6</sub>, Magvit B<sub>6</sub> i Magne B<sub>6</sub>. Dolomit VIS, Magne-zin, Slow-Mag i Slow-Mag B<sub>6</sub>).

Większość badanych produktów farmaceutycznych i suplementów diety miała postać tabletek. Formy farmaceutyczne pozostałych preparatów, to tabletki powlekane (Cardiomin B<sub>6</sub>, Dipromal 200 mg, Magne B<sub>6</sub> max, Mg B<sub>6</sub>, NeoMag Cardio, NeoMag forte, Zdrovit Skurcz), tabletki odporne na działanie soku żołądkowego (Magne B<sub>6</sub>, Magvit B<sub>6</sub>, Slow-Mag, Slow-Mag B<sub>6</sub>) i tabletki musujące (Magnesol 150, Zdrovit magnez + vit. B<sub>6</sub>, Zdrovit Magnum forte). Oprócz tego, dwa suplementy diety miały postać kapsułek (Chela-Mag B<sub>6</sub>, BluMag Jedyny). Wszystkie badane produkty zawierały różne ilości substancji pomocniczych.

#### 4.1. Identyfikacja składników badanych produktów

Wyniki badań DSC 30. produktów farmaceutycznych i suplementów diety zestawiono w Tabeli 21 [Wesołowski et al., 2014]. Wstępna analiza tych danych wskazała na duży wpływ zawartości substancji aktywnych na możliwość ich identyfikacji. Uogólniając, badane produkty lecznicze i suplementy diety zawierały większe ilości soli magnezu kwasów organicznych (około 50–90% masy tabletki), niż soli nieorganicznych, z wyjątkiem suplementu diety BluMag Jedyny, który zawierał powyżej 93% MgO w tabletce. W przypadku większości produktów producenci podają informacje o zawartości soli magnezu w przeliczeniu na jony Mg<sup>2+</sup>, niezależnie od faktu, że niektóre z nich zawierają dwie lub trzy sole magnezu. Dla przykładu, w produkcie Bio-Magnez zawartość octanu magnezu, MgCO<sub>3</sub> i Mg(OH)<sub>2</sub> określono jako 19,9% jonów Mg<sup>2+</sup>, zaś w przypadku Cardiominu B<sub>6</sub> zawierającego wodoroasparaginian i cytrynian magnezu oraz MgO, zawartość tych jonów określono jako 12,4%. Z tego względu niemożliwe jest precyzyjne określenie procentowej zawartości każdej soli w preparacie.

Interpretacja krzywych DSC badanych preparatów wykazała, że do wykrycia substancji czynnych mogą posłużyć piki endotermiczne związane z dehydratacją soli magnezu. Przykład to krzywa DSC leku Dipromal 200 mg, która porównana z krzywą walproinianu magnezu użytą jako wzorzec potwierdza obecność substancji czynnej w próbce (Rys. 21). Podobnie, na krzywej DSC suplementu diety Bio-Magnez występuje pik endotermiczny dehydratacji octanu magnezu (Tabela 21). W przypadku pozostałych substancji aktywnych, MgCO<sub>3</sub> i Mg(OH)<sub>2</sub>, w badanym zakresie nie wystąpiły żadne procesy termiczne.

Lp.	Produkty farmaceutyczne i suplementy diety	Związki magnezu (aktywne składniki)	Dawka aktywnego składnika w tabletce g	Średnia masa tabletki g	Zawartość aktywnego składnika w tabletce %	Temperatura piku DSC °C	Entalpia przemiany J/g	Współczynniki dopasowania widm FT-IR %	Współczynniki dopasowania widm Ramana %		
Produkty zawierające sole magnezu kwasów organicznych											
1.	Bio-Magnez	octan węglan wodorotlenek	0,200 <sup>a</sup>	1,0065	19,9 <sup>a</sup>	76,46	74,56	39,68 49,50 61,70	44,30 57,60 27,95		
2.	Dipromal 200 mg	walproinian	0,200	0,3283	60,9	136,12	100,00	96,60	10,85		
3.	Mg B <sub>6</sub>	mleczan	0,050 <sup>a</sup>	0,6467	7,7 <sup>a</sup>	161,99	365,01	44,82	61,73		
4.	Maglek B <sub>6</sub>	mleczan	0,500	0,8014	62,4	162,25	502,65	44,04	62,03		
5.	Magvit B <sub>6</sub>	mleczan	0,500	0,7320	68,3	160,43	298,97	44,82	61,63		
6.	Magne B <sub>6</sub>	mleczan	0,500	0,9049	55,3	166,56	294,93	44,34	56,61		
7.	Magnesol 150	mleczan	0,150 <sup>a</sup>	6,4900	2,3 <sup>a</sup>	_	_	21,94	15,20		
8.	Magne B <sub>6</sub> max	cytrynian	0,100 <sup>a</sup>	0,7859	12,7 <sup>a</sup>	185,37	436,74	44,68	17,63		
9.	Magnefar B <sub>6</sub>	cytrynian	0,500	0,8491	58,9	181,85	447,01	43,98	17,88		
10.	Magnefar B <sub>6</sub> Cardio	cytrynian	0,033 <sup>a</sup>	0,8827	3,7 <sup>a</sup>	174,79	270,20	49,07	20,99		
11.	Asmag	wodoroasparaginian	0,300	0,3942	76,1	175,36	406,73	97,78	87,71		
12.	Asmag Forte	wodoroasparaginian	0,500	0,5672	88,2	173,74	529,73	98,92	93,84		
13.	Asmag B	wodoroasparaginian	0,300	0,3990	75,2	179,86	491,53	97,88	93,60		
14.	Filomag B <sub>6</sub>	wodoroasparaginian	0,600	0,6985	85,9	172,95	592,01	99,03	93,18		
15.	Laktomag B <sub>6</sub>	wodoroasparaginian	1,00	1,3388	74,7	173,37	260,85	99,04	94,19		
16.	Aspargin	wodoroasparaginian	0,25	0,6928	36,1	167,93	370,76	77,78	86,38		
17.	Asparaginum forte Mg+K	wodoroasparaginian węglan	0,015 <sup>a</sup>	0,2830	5,3 <sup>a</sup>	_	_	14,37 54,86	11,41 5,75		

# Tabela 21 Wyniki badań DSC, FT-IR i Ramana produktów farmaceutycznych i suplementów diety zawierających związki magnezu.

18.	Cardiomin B <sub>6</sub>	wodoroasparaginian cytrynian tlenek	0,250 <sup>a</sup>	2,0163	12,4 ª	181,11	18,53	14,57 0,91 16,00	10,78 2,54 9,03	
19.	Chela-Mag B <sub>6</sub>	diglicynian	0,555	0,6067	91,5	146,17	151,31	43,28	27,44	
Produkty zawierające nieorganiczne sole magnezu										
20.	BluMag Jedyny	tlenek	0.622	0,6666	93,2	_	—	0,01	7,74	
21.	Zdrovit Skurcz	tlenek	0.050 <sup>a</sup>	0,5440	9,2 <sup>a</sup>	_	—	6,27	6,47	
22.	Magnezin	węglan	0.500	0,6713	74,5	_	—	50,91	78,07	
23.	NeoMag forte	węglan	0.100 <sup>a</sup>	0,5558	18,0 <sup>a</sup>	—	—	51,96	81,78	
24.	Zdrovit magnez+vit B <sub>6</sub>	węglan	0.100 <sup>a</sup>	4,1020	2,4 <sup>a</sup>	_	—	0,01	2,76	
25.	Zdrovit Magnum Forte	węglan	0.300 <sup>a</sup>	4,4640	6,7 <sup>a</sup>	-	—	7,80	24,85	
26.	Dolomit VIS	węglan	0.032 <sup>a</sup>	0,4922	6,5 <sup>a</sup>	_	—	5,16	15,59	
27.	Asparaginian extra	węglan	0.036 <sup>a</sup>	0,8111	4,4 <sup>a</sup>	_	—	47,21	5,01	
28.	NeoMag Cardio	węglan	0.035 <sup>a</sup>	0,6197	5,6 <sup>a</sup>	_	—	34,86	18,34	
29.	Slow-Mag	chlorek	0.535	0,9366	57,1	118,15	218,96	88,03	2,70	
30.	Slow-Mag B <sub>6</sub>	chlorek	0.535	0,9334	57,3	117,04	78,91	84,57	3,88	

 $^{\rm a}$ Zawartość składników aktywnych w produktach podano w przeliczeniu na jony  ${\rm Mg}^{2^+}$ 



Rys. 21 Krzywe DSC produktu leczniczego Dipromal 200 mg, walproinianu magnezu (substancja aktywna) i substancji pomocniczych.

Cztery preparaty: MgB<sub>6</sub>, Maglek B<sub>6</sub>, Magvit B<sub>6</sub> i Magne B<sub>6</sub> zawierają niemal identyczne ilości substancji aktywnych (mleczanu magnezu i chlorowodorku pirydoksyny), ale są wytwarzane przez różnych producentów, w związku z tym różnią się rodzajem i ilością substancji pomocniczych. Na krzywych DSC tych produktów w zakresie temperatur 125–175°C widoczne są silne i szerokie piki, co potwierdza obecność mleczanu magnezu. Brak jest wyraźnego sygnału odzwierciedlającego obecność witaminy B<sub>6</sub> z uwagi na jej małą zawartość (5–6 mg). Krzywe DSC pozostałych suplementów diety: Magne B<sub>6</sub> max, Magnefar B<sub>6</sub> i Magnefar B<sub>6</sub> Cardio wyraźnie odzwierciedlają dehydratację mleczanu magnezu, co umożliwia jego identyfikację. W przypadku tabletek Magnesol 150 nie występuje jednak endotermiczny pik DSC, który można by przypisać dehydratacji mleczanu magnezu. Prawdopodobnie efekty termiczne związane z gwałtowną reakcją pomiędzy składnikami mieszaniny musującej (wodorowęglanem sodu i kwasem cytrynowym), skutkującą uwolnieniem ditlenku węgla i wody, uniemożliwiaj identyfikację pików DSC związanych z dehydratacją.

Podobnie do cytrynianu i mleczanu magnezu, duża ilość wodoroasparaginianu magnezu w tabletkach Asmag, Asmag Forte, Asmag B, Filomag B<sub>6</sub>, Laktomag B<sub>6</sub> i Aspargin (produkty farmaceutyczne) umożliwia łatwe wykrycie tej soli dzięki wysokiemu, endotermicznemu pikowi DSC związanemu z dehydratacją (Tabela 21). Suplementy diety: Asparaginum forte Mg + K i Cardiomin B<sub>6</sub> również zawierają wodoroasparaginian magnezu, ale ich skład jest bardziej złożony. W pierwszym z nich występuje węglan wapnia oraz wodoroasparaginian i chlorek potasu, zaś w drugim również cytrynian i tlenek magnezu, wodoroasparaginian, glukonian i cytrynian potasu oraz wodoroasparaginian, cytrynian i tlenek wapnia. Dlatego na krzywych DSC występują piki o małej intensywności, które trudno zinterpretować. Brak jest wyraźnych sygnałów wynikających z obecności soli magnezu jako głównych składników w badanych produktach.



Rys. 22 Krzywe DSC produktu farmaceutycznego Dolomit VIS, węglanu magnezu i węglanu wapnia (substancje aktywne) oraz substancji pomocniczych.

Kolejna grupa preparatów zawiera nieorganiczne sole magnezu. Niemożliwe było wykrycie przy pomocy DSC tych substancji w suplementach diety BluMag Jedyny i Zdrovit Skurcz (MgO) oraz w tabletkach Magnezin, NeoMag forte, Zdrovit magnez + vit B<sub>6</sub>, Zdrovit Magnum Forte, Dolomit VIS, Asparaginian extra, NeoMag Cardio, Slow-Mag i Slow-Mag B<sub>6</sub> (MgCO<sub>3</sub>), ponieważ MgO i MgCO<sub>3</sub> nie są aktywne termicznie w badanym zakresie temperatur. Jak wynika z Rys. 22, niewielkie piki endotermiczne odzwierciedlają topnienie substancji pomocniczych: laktozy (około 143°C) i sacharozy (około 189°C). Z drugiej strony, krzywe DSC produktów Slow-Mag i Slow-Mag B<sub>6</sub> wykazały, że w produktach leczniczych można łatwo zidentyfikować obecność MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O dzięki charakterystycznym, endotermicznym pikom związanym z dehydratacją.

#### 4.2. Analiza FT-IR produktów ze związkami magnezu

Widma FT-IR związków magnezu i witaminy B<sub>6</sub> w zakresie 4000–400 cm<sup>-1</sup> składają się ze złożonych ciągów ostrych pasm odpowiadających drganiom grup funkcyjnych w cząsteczce. Do interpretacji wybrano dwa obszary spektralne: 3600–2800 cm<sup>-1</sup> i 1800–1000 cm<sup>-1</sup> (Rys. 23) [Wesołowski et al., 2014]. Najcenniejszy jest zakres widma określany jako daktyloskopowy (1800–1000 cm<sup>-1</sup>), ponieważ jest on częściowo pozbawiony pasm substancji pomocniczych. Uzupełnieniem tego obszaru jest zakres spektralny 3600–2800 cm<sup>-1</sup>, w którym mogą znajdować się charakterystyczne pasma związane z obecnością wiązań N–H, C–H i O–H. W przypadku substancji pomocniczych o charakterze węglowodanów (glukoza, laktoza, sacharoza, skrobia, celuloza), w obszarze tym obserwuje się charakterystyczne pasma drgań rozciągających wiązań

O–H oraz C–H. W celu przypisania pasm w widmach soli magnezu do grup chemicznych organicznych części substancji czynnych, posłużono się dostępnymi w literaturze danymi [Sasic & Ozaki, 2010; Silverstein et al., 2007; Skoog et al., 2007]. Interpretacja widm produktów farmaceutycznych i suplementów diety wykazała, że pomimo złożonego składu chemicznego badanych próbek ich widma odzwierciedlają charakterystyczne pasma związane z obecnością soli magnezu kwasów organicznych w preparacie.



Rys. 23 Widma FT-IR: (a) tetrahydratu octanu magnezu (b) cytrynianu magnezu, (c) dihydratu mleczanu magnezu, (d) walproinianu magnezu, (e) tetrahydratu wodoroasparaginianu magnezu, (f) tlenku magnezu, (g) wodorotlenku magnezu, (h) węglanu magnezu, (i) heksahydratu chlorku magnezu i (j) chlorowodorku pirydoksyny.



Rys. 24 Widma FT-IR produktu leczniczego Magvit B<sub>6</sub> zawierającego mleczan magnezu i chlorowodorek pirydoksyny oraz substancje pomocnicze.

Dla przykładu, widmo preparatu Magvit B<sub>6</sub> wykazuje duże podobieństwo do widma mleczanu magnezu (Rys. 24). Niewielka różnica widm prawdopodobnie wynika z obecności substancji pomocniczych. Z drugiej strony, brak jest podobieństwa między widmami FT-IR nieorganicznych soli magnezu i widmami produktów farmaceutycznych i suplementów diety zawierających te substancje. Wynika to prawdopodobnie z braku charakterystycznych, silnych

pasm odpowiadających cząsteczce MgO (Rys. 23, widma f i g). Wyjątek stanowią niektóre tabletki zawierające MgCO<sub>3</sub> i MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O. Jak pokazano na Rys. 25, widmo tabletek NeoMag Forte odzwierciedla obecność MgCO<sub>3</sub> w tym suplemencie diety. Ten sam wniosek można wyciągnąć dla tabletek: Slow-Mag i Slow-Mag B<sub>6</sub>. W przypadku drugiego z preparatów, oprócz MgCl<sub>2</sub>·H<sub>2</sub>O tabletki zawierają również witaminę B<sub>6</sub>.



Rys. 25 Widma FT-IR suplementu diety NeoMag Forte zawierającego węglan magnezu i chlorowodorek pirydoksyny oraz substancje pomocnicze.

Wartości współczynników dopasowania dla wszystkich badanych produktów zawarto w Tabeli 21. Wykazały one, że w przypadku wodoroasparaginianu magnezu, głównego składnika sześciu produktów leczniczych, wartości współczynników dopasowania ich widm FT-IR do widma wodoroasparaginianu magnezu mieszczą się w zakresie 97,78–99,04%. Wyjątkiem jest współczynnik dopasowania preparatu Aspargin, który jest niższy, wynosi około 78%. Fakt ten sugeruje, że widma tych produktów niemal pokrywają się z widmem wodoroasparaginianu magnezu. Duże podobieństwo do widma walproinianu magnezu wykazują tabletki Dipromal 200 mg (96,60%), podczas gdy współczynniki dopasowania dla produktów zawierających mleczan i cytrynian magnezu mieszczą się w zakresach, odpowiednio 44,04–44,82% i 43,98– 49,07%. W przypadku tabletek musujących Magnesol 150, współczynnik dopasowania wyniósł około 22% wskazując, że nie ma on praktycznego znaczenia z punktu widzenia potwierdzenia obecności tego składnika w suplemencie diety.

Z wyjątkiem niektórych produktów zawierających MgCO<sub>3</sub>, takich jak Bio-Magnez, Asparaginum forte Mg + K, Magnezin, NeoMag Forte, Asparaginian extra i Neo-Mag Cardio, współczynniki dopasowania widm FT-IR pozostałych tabletek zawierających MgCO<sub>3</sub> lub MgO są generalnie niskie, mieszczą się w zakresie od 0,01 do 16,0%. Fakt ten wskazuje, że podobnie jak w przypadku tabletek musujących Magnesol 150, składniki mieszaniny musującej zawarte w tabletkach Zdrovit magnez + wit.  $B_6$  oraz Zdrovit Magnum forte, a także niektóre substancje pomocnicze w tabletkach Dolomit VIS sprawiają, że ich widma FT-IR różnią się znacznie od widm MgCO<sub>3</sub>, co uniemożliwia identyfikację węglanu w preparacie.

### 4.3. Widma Ramana produktów ze związkami magnezu

Widma Ramana wskazują, że organiczna część soli magnezu kwasów organicznych (Rys. 26, widma a-e) i witamina B<sub>6</sub> (Rys. 26, widmo j) generują charakterystyczne częstości Ramana dla grup funkcyjnych występujących w tych związkach [Wesołowski et al., 2014]. Tymi charakterystycznymi pasmami można posłużyć się w celu wykrycia głównych składników badanych produktów. Z drugiej strony, widma Ramana nieorganicznych soli magnezu nie są charakterystyczne, ponieważ poszczególne pasma powiązane z drganiami oscylacyjnymi lub rotacyjnymi cząsteczek mają albo niską intensywność (Rys. 26, widma f, g), albo nie występują wcale (Rys. 26, widmo i) [Sasic & Ozaki, 2010; Skoog et al., 2007]. Jest to niedogodność z punktu widzenia identyfikacji soli nieorganicznych. Jedynie w przypadku węglanu magnezu pasmo Ramana jest intensywne (widmo h) i może być użyte do jej wykrycia.



Rys. 26 Widma Ramana: (a) tetrahydratu octanu magnezu (b) cytrynianu magnezu, (c) dihydratu mleczanu magnezu, (d) walproinianu magnezu, (e) tetrahydratu wodoroasparaginianu magnezu, (f) tlenku magnezu, (g) wodorotlenku magnezu, (h) węglanu magnezu, (i) heksahydratu chlorku magnezu i (j) chlorowodorku pirydoksyny.

Dane zamieszczone w Tabeli 21 wskazują, że dla wodoroasparaginianu i mleczanu magnezu, które są głównymi składnikami badanych produktów, współczynniki dopasowania mieszczą się w zakresie, odpowiednio 86,38–94,19% i 56,61–62,03%. Fakt ten wskazuje, że widma Ramana tych produktów prawie pokrywają się z widmami wodoroasparaginianu i mleczanu. Największe podobieństwo do widma wodoroasparaginianu magnezu wykazują tabletki Laktomag B<sub>6</sub>, ale pomimo relatywnie niskiej zawartości tej soli w tabletkach Aspargin

(36,1%), współczynnik dopasowania widma tego produktu do widma soli magnezu przekracza 77%. Ponadto, ze względu na złożony skład tabletek Asparaginum forte Mg+K i Cardiomin B<sub>6</sub>, obecność wodoroasparaginianu i pozostałych substancji czynnych w tych suplementach diety odzwierciedlają niskie współczynniki dopasowania, podobnie jak w przypadku widm FT-IR. Współczynniki dopasowania produktów farmaceutycznych zawierających cytrynian magnezu mieszczą się w zakresie 15,20–20,99%, co nie ma praktycznego znaczenia przy wykrywaniu tego składnika. Podobnie wygląda sytuacja tabletek Dipromal 200 mg.



Rys. 27 Widma Ramana suplementu diety Bio-Magnez, zawierającego octan magnezu, węglan magnezu i wodorotlenku magnezu oraz substancje pomocnicze.



Rys. 28 Widma Ramana suplementu diety BluMag Jedyny zawierającego tlenek magnezu i chlorowodorek pirydoksyny oraz substancje pomocnicze.

Współczynniki dopasowania widma tabletek Bio-Magnez do widm octanu magnezu, MgCO<sub>3</sub> i Mg(OH)<sub>2</sub> są częściowo porównywalne z danymi uzyskanymi dla przypadku widm FT-IR (Tabela 21). Jak pokazano na Rys. 27, można wykryć octanu magnezu i MgCO<sub>3</sub> w suplemencie diety na podstawie widma Ramana. Z wyjątkiem tabletek Magnezin i NeoMag forte, dla których współczynniki dopasowania wyniosły, odpowiednio 78,07 i 81,78%,

obecności MgO, MgCO<sub>3</sub> i MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O w pozostałych produktach nie zdołano potwierdzić na podstawie współczynników dopasowania, pomimo wysokiej zawartości głównych składowych. Przykładem mogą być tabletki BluMag Jedyny (Rys. 28).

# V. WNIOSKI

- 1. Na podstawie badań DSC, DTA, TG i DTG rozkładu termicznego pochodnych puryny (teofiliny, teobrominy, kofeiny, diprofiliny i aminofiliny) i związków magnezu (octanu, walproinianu, mleczanu, cytrynianu i wodoroasparaginianu), zaproponowano ogólny schemat destrukcji termicznej badanych związków, wydzielając kilka podstawowych etapów rozkładu termicznego. W oparciu o uzyskane dane podano zakresy temperatur, w których analizowane substancje nie ulegają rozkładowi i mogą być poddane rożnym procesom technologicznym.
- 2. Stwierdzono, że rozkład termiczny metyloksantyn jest zbliżony. Teofilina, teobromina i kofeina ulegają rozkładowi podczas topnienia, diprofilina po stopieniu jest stosunkowo trwała i paruje w wyższych temperaturach. Rozkład termiczny kofeiny i diprofiliny można opisać jako proces trójetapowy, a teofiliny, teobrominy i aminofiliny jako dwu-etapowy. W etapie I nie zachodzą żadne procesy związane ze zmianą struktury chemicznej badanego związku, co uwidacznia się na krzywych TG i DTG brakiem ubytku masy. Występujące w tym etapie wysokie, wąskie i ostro zakończone endotermiczne piki DTA lub DSC odzwierciedlają przemiany fazowe, np. topnienie lub przemianę polimorficzną. Ubytek masy w tym etapie powoduje jedynie dehydratacja aminofiliny. W etapie II zachodzi destrukcja termiczna związków z utworzeniem pośrednich produktów rozkładu, której towarzyszy ponad 90% ubytek masy. Zwęglona pozostałość po tym etapie spala się w etapie III rozkładu.
- 3. W przypadku soli magnezu kwasów organicznych, rozkład termiczny przebiega w dwóch etapach. W etapie I, obejmującym zakres temperatur 35–225°C następuje dehydratacja. Potwierdza to ubytek masy na krzywych TG i DTG dla czterech soli magnezu: octanu, walproinianu, mleczanu i wodoroasparaginianu. Endotermiczne piki DTA i DSC także potwierdzają dehydratację. Bezwodne związki ulegają całkowitej destrukcji termicznej w etapie II z utworzeniem MgO jako końcowego produktu rozkładu. Z kolei nieorganiczne związki magnezu tlenek, wodorotlenek i węglan nie podlegają żadnej transformacji termicznej w badanym zakresie temperatur. Wyjątkiem jest chlorek magnezu, który ulega dehydratacji.
- 4. Zastosowanie analizy głównych składowych (PCA) do interpretacji danych uzyskanych z krzywych DTA, TG i DTG rozkładu badanych substancji umożliwiło określenie relacji pomiędzy masą próbki i szybkością ogrzewania a przebiegiem destrukcji termicznej

pochodnych puryny i soli magnezu kwasów organicznych, a ponadto poszukiwanie relacji pomiędzy strukturą chemiczną a rozkładem termicznym badanych związków.

- 5. Obliczenia PCA wykazały, że rozkład termiczny substancji uwarunkowany jest głównie szybkością ogrzewania. Badając relacje pomiędzy masą próbki i szybkością ogrzewania ustalono, że masa próbki przy szybkości ogrzewania 3°C/min wpływa na wyniki rozkładu w mniejszym stopniu, niż przy szybkości wynoszącej 15°C/min. Wynika z tego, że optymalne warunki do prowadzenia badań nad rozkładem substancji organicznych to ogrzewanie 100 mg próbek z szybkością od 5 do 10°C/min. Obliczenia PCA wykazały również, że sole magnezu kwasów organicznych o podobnej budowie chemicznej znajdują się na wykresie PCA w zbliżonych zakresach wartości PC1 i PC2, co dowodzi, że ich destrukcja termiczna odzwierciedla podobieństwo w strukturze chemicznej
- 6. Badaniom poddano również dostępne bez recepty preparaty farmaceutyczne i suplementy diety (łącznie 57 produktów), zawierające pochodne puryny i związki magnezu. Wykazano, że w większości przypadków techniki DSC, FT-IR i Ramana mogą być wykorzystane do wykrycia głównego składnika w tych preparatach. Duży wpływ na przydatność technik DSC, FT-IR i Ramana do wykrywania substancji ma zawartość aktywnych składników w badanych preparatach.
- 7. Porównując trzy użyte techniki instrumentalne stwierdzono, że wyniki uzyskane przy pomocy spektroskopii Ramana były przydatne w niewielkim stopniu. Współczynniki dopasowania były dwukrotnie niższe, niż te uzyskane przy zastosowaniu spektroskopii FT-IR, a w przypadku produktów z kofeiną były kilkukrotnie niższe w porównaniu do uzyskanych przy użyciu spektroskopii FT-IR. Wyjątkiem były jedynie preparaty zawierające kwas acetylosalicylowy, dla których współczynniki dopasowania były kilkukrotnie wyższe, niż te wygenerowane na podstawie widm FT-IR. DSC okazała się najbardziej przydatną tchniką, stwierdzono, że wysokie, wąskie i ostro zakończone endotermiczne piki DSC związane z przemianami fazowymi, głównie topnieniem i parowaniem, są użyteczne podczas identyfikacji substancji w badanych preparatach. Do wykrywania związków magnezu można posłużyć się endotermicznymi pikami DSC związanymi z dehydratacją.

# 8. VI. PIŚMIENNICTWO

- Abiad M.G., Gonzalez D.C., Mert B., Campanella O.H., Carvajal M.T., 2010, A novel method to measure the glass and melting transitions of pharmaceutical powders. Int. J. Pharm., 396, 23-29.
- Adeyeye M.Ch., Brittain H.G. (Eds.), 2008, Preformulation in Solid Dosage Form Development. Informa, Healthcare, New York.
- Ahmad Z., Kumar V., Kumar A., Akhter S., 2010, Drug-excipient(s) interactions and compatibility study: A review. J. Pharm. Res., 3, 2092-2095.
- Ali F., Nandi U., Trivedi M., Prakash A., Dahiya M., Sahu P.L., Kumar R., Singh G.N., 2018, Quantitative characterization and pharmaceutical compatibility between teneligliptin and widely used excipients by using thermal and liquid chromatography tandem mass spectrometry techniques. J. Therm. Anal. Calorim., 132, 385-396.
- Bajdik J., Baki G., Szent-Királlyi Z., Knop K., Kleinebudde P., Pintye-Hódi K., 2008, Evaluation of the composition of the binder bridges in matrix granules prepared with a small-scale high-shear granulator. J. Pharm. Biomed. Anal., 48, 694-701.
- Barker S.A., Yuen K.H., Craig D.Q.M., 2000, An investigation into the low temperature thermal behaviour of vitamin E preparation USP using differential scanning calorimetry and low frequency dielectric analysis. J. Pharm. Pharmacol., 52, 941-947.
- Barnes A.F., Hardy M.J., Lever T.J., 1993, A review of the applications of thermal methods within the pharmaceutical industry. J. Therm. Anal., 40, 499-509.
- Bashaiwoldu A.B., Podczeck F., Newton J.M., 2004a, Application of dynamic mechanical analysis (DMA) to determine the mechanical properties of pellets. Int. J. Pharm., 269, 329-342.
- Bashaiwoldu A.B., Podczeck F., Newton J.M., 2004b, Application of dynamic mechanical analysis (DMA) to the determination of the mechanical properties of coated pellets. Int. J. Pharm., 274, 53-63.
- Bauer S., Santon R., Quick H.J., Dziki W., Porter W., Morris J., 2001, Ritonavir: An extraordinary example of conformational polymorphism. Pharm. Res., 18, 859-866.
- Berbenni V., Marini A., Bruni G., Maggioni A., Cogliati P., 2002, Thermoanalytical and spectroscopic characterization of solid state dipyridamole. J. Therm. Anal. Calorim., 68, 413-422.
- Bernardi L., Ferreira F.F., Cuffini S., Campos C.E.M., Monti G.A., Kuminek G., Oliveira P.R., Gardoso S.G., 2013, Solid-state evaluation and polymorphic quantitation of venlafaxine hydrochloride raw materials using the Rietveld method. Talanta, 117, 189-195.
- Bertol C.D., Cruz A.P., Stulzer H.K., Murakami F.S., Silva M.A.S., 2010, Thermal decomposition kinetics and compatibility studies of primaquine under isothermal and non-isothermal conditions. J. Therm. Anal. Calorim., 102, 187-192.
- Bezerra B.P., Fonseca J.C., Santiago de Oliveira Y., de Santana M.S.A., Silva K.F., Araujo B.S., Ayala A.P., 2016, Phase transitions in secnidazole: Thermal stability and polymorphism studied by X-ray powder diffraction, thermal analysis and vibrational spectroscopy. Vib. Spectr., 86, 90-96.
- Bharate S.S., Bharate S.B., Bajaj A.N., 2010, Interactions and incompatibilities of pharmaceutical excipients with active pharmaceutical ingredients: A comprehensive review. J. Exc. Food Chem., 1, 3-26.
- Bi M., Hwang S.J., Morris K.R., 2003, Mechanism of eutectic formation upon compaction and its effects on tablet properties. Thermochim. Acta, 404, 213-26.
- Bielański A., 2012, Podstawy chemii nieorganicznej. Wyd. VI, PWN, Warszawa.
- Bothe H., Cammenga H.K., 1979, Phase transitions and thermodynamic properties of anhydrous caffeine. J. Therm. Anal., 16, 267-275.
- Brewster M.E., Loftsson T., 2007, Cyclodextrins as pharmaceutical solubilizers. Adv. Drug Deliv. Rev., 59, 645-666.
- Bronowicz P., Saganowska P., Wesołowski M., 2016, Kokryształy nowy sposób na zwiększenie rozpuszczalności substancji leczniczej. Farm. Pol., 72, 622-628.

- Bruni G., Amici L., Berbenni V., Marini A., Orlandi A., 2002, Drug-excipient compatibility studies. Search of interaction indicators. J. Therm. Anal. Calorim., 68, 561-573.
- Bruni G., Milanese C., Berbenni V., Sartor F., Villa M., Marini A., 2010, Crystalline and amorphous phases of a new drug. J. Therm. Anal. Calorim., 102, 297-303.
- Budai M., Szabo Z., Szogyi M., Grof P., 2003, Molecular interactions between DPPC and morphine derivatives: a DSC and EPR study. Int. J. Pharm., 250, 239-250.
- Caira M.R., Dodds D.R., Nassimbeni L.R., 2002, Polymorphism and cyclodextrin inclusion of salbutamol laurate. J. Therm. Anal. Calorim., 68, 647-655.
- Carpentier L., Bourgeois L., Descamps M., 2002, Contribution of temperature modulated DSC<sup>®</sup> to the study of the molecular mobility in glass forming pharmaceutical systems. J. Therm. Anal. Calorim., 68, 727-739.
- Cavallari C., Tarterini F., Fini A., 2016, Thermal characterization of some polymorph solvates of the antiinflammatory/anti-cancer sulindac. Thermochim. Acta, 633, 129-139.
- Chadha R., Arora P., Bhandari S., Bala M., 2012, Thermomicroscopy and its pharmaceuticals applications. in Current Microscopy Contributions to Advances in Science and Technology. Méndez-Vilas A. (Ed.). Formatex Research Center, Badajoz, vol. 2, 1013-1024.
- Chadha R., Bhandari S., 2014, Drug-excipient compatibility screening role of thermoanalytical and spectroscopic techniques. J. Pharm. Biomed. Anal., 87, 82-97.
- Chavan R.B., Shastri N.R., 2018, Polymorphic transformation as result of atovaquone incompatibility with selected excipients. J. Therm. Anal. Calorim., 131, 2129-2139.
- Clas S.D., Dalton Ch.R., Hancock B.C., 1999, Differential scanning calorimetry: Applications in drug development. Pharm. Sci. Technol. Today, 2, 311-320.
- Coleman N.J., Craig D.Q.M., 1996, Modulated temperature differential scanning calorimetry: a novel approach to pharmaceutical thermal analysis. Int. J. Pharm., 135, 13-29.
- Costa S.P.M., Silva K.E.R., Medeiros G.Ch.R., Rolim L.A., Oliveira J.F., Lima M.C.A., Galdino S.L., Pitta I.R., Neto P.J.R., 2013, Thermal behavior and compatibility analysis of the new chemical entity LPSF/FZ4. Thermochim. Acta, 563, 29-34.
- Craig D.Q.M., Reading M. (Eds.), 2007, Thermal Analysis of Pharmaceuticals. CRC Press, Boca Raton.
- Daniel J.S.P., Veronez I.P., Rodrigues L.L., Trevisan M.G., Garcia J.S., 2013, Risperidone solid-state characterization and pharmaceutical compatibility using thermal and non-thermal techniques. Thermochim. Acta, 568, 148-155.
- Danley R.L., 2003, New modulated DSC measurement technique. Thermochim. Acta, 402, 91-98.
- De Angelis N.J., Papariello G.J., 1968, Differential scanning calorimetry: Advantages and limitations for absolute purity determinations. J. Pharm. Sci., 57, 1868-1873.
- Desai S.R., Shaikh M.M., Dharwadkar S.R., 2003, Thermoanalytical study of polymorphic transformation in fluconazole drug. Thermochim. Acta, 399, 81-89.
- Diogo H.P., Ramos J.J.M., Piedade M.F.M., 2018, Thermal behavior and dynamic fragility in amorphous carisoprodol. Correlation between the dynamic and thermodynamic fragilities. Thermochim. Acta., 663, 99-109.
- Duda-Seiman C., Vlase T., Vlase G., Cinca R., Anghel M., Doca N., 2011, Thermal behavior of verapamil in pure and in solid dosage forms. J. Therm. Anal. Calorim., 105, 851-858.
- Éhen Z., Giordano F., Sztatisz J., Jicsinszky L., Novák Cs., 2005, Thermal characterization of natural and modified cyclodextrins using TG-MS combined technique. J. Therm. Anal. Calorim., 80, 419-424.
- Esbensen K.H., Swarbrick B., 2018, Multivariate Data Analysis. An Introduction to Multivariate Analysis, Process Analytical Technology and Quality by Desing. 6th ed., CAMO, Oslo.
- European Pharmacopoeia 5, Publ. Council of Europe, Strasbourg 2005.

Farmakopea Polska VIII, Wyd. Ministerstwo Zdrowia, Warszawa 2008.

Fattah H.A., Hammad M.A., El-Megrab N., Barakat W., Samir A., 2012, Modulation of clonazepan solubility using solid dispersion technique improves its solubility and bioavailability. Asian J. Res. Chem., 5, 446-455.

Ford J.L., Mann T.E., 2012, Fast-scan DSC and its role in pharmaceutical physical form characterisation and selection. Adv. Drug Deliv. Rev., 64, 422-430.

Ford J.L., Timmins P., 1989, Pharmaceutical Thermal Analysis. Ellis Horwood, Chichester.

Gabbott P. (Ed.), 2008, Principles and Applications of Thermal Analysis. Blackwell Publishing, Oxford.

- Gaisford S., Buanz A.B.M., 2011, Pharmaceutical physical form characterisation with fast (>200 °C min<sup>-1</sup>) DSC heating rates. J. Therm. Anal. Calorim., 106, 221-226.
- Gaisford S., Buckton G., 2001, Potential applications of microcalorimetry for the study of physical processes in pharmaceutical. Thermochim. Acta, 380, 185-198.
- Galwey A.K., 2007, Review Paper. Melting and thermal decompositions of solids. An appraisal of mechanistic interpretations of thermal processes in crystals. J. Therm. Anal. Calorim., 87, 601-615.
- Garbacz P., Wesołowski M., 2018, DSC, FTIR and Raman spectroscopy coupled with multivariate analysis in a study of co-crystals of pharmaceutical interest. Molecules, 29, Article ID 23-02136.
- Giordano F., Novák C., Moyano J.R., 2001, Thermal analysis of cyclodextrins and their inclusion compounds. Thermochim. Acta, 380, 123-151.
- Giordano F., Rossi A., Pasquali I., Bettini R., Frigo E., Gazzaniga A., M.E., Sangalli M.E., Mileo V., Catinella S., 2003, Thermal degradation and melting point determination of diclofenac. J. Therm. Anal. Calorim., 73, 509-518.
- Giron D., 1990, Thermal analysis in pharmaceutical routine analysis. Acta Pharm. Jugosl., 40, 95-157.
- Giron D., 1995, Thermal analysis and calorimetric methods in the characterization of polymorphs and solvates. Thermochim. Acta, 248, 1-59.
- Giron D., 1998, Contribution of thermal methods and related techniques to the rational development of pharmaceuticals. Part 1. Pharm. Sci. Technol. Today, 5, 191-199.
- Giron D., 2002, Applications of thermal analysis and coupled techniques in pharmaceutical industry. J. Therm. Anal. Calorim., 68, 335-357.
- Giron D., Goldbronn C., 1995, Place of DSC purity analysis in pharmaceutical development. J. Therm. Anal., 44, 217-251.
- Giron D., Goldbronn C., Mutz M., Pfeffer S., Piechon Ph., Schwab Ph., 2002, Solid state characterizations of pharmaceutical hydrates. J. Therm. Anal. Calorim., 68, 453-465.
- Giron D., Monnier S., Mutz M., Piechon P., Buser T., Stowasser F., Schulze K., Bellus M., 2007, Comparison of quantitative methods for analysis of polyphasic pharmaceuticals. J. Therm. Anal. Calorim., 89, 729-743.
- Giron D., Mutz M., Garnier S., 2004, Solid-state of pharmaceutical compounds. Impact of the ICH Q6 guideline on industrial development. J. Therm. Anal. Calorim., 77, 709-747.
- Giron. D., 2001, Investigations of polymorphism and pseudo-polymorphism in pharmaceuticals by combined thermoanalytical techniques. J. Therm. Anal. Calorim., 64, 37-60
- Gosselin P.M., Thibert R., Preda M., McMullen J.N., 2003, Polymorphic properties of micronized carbamazepine produced by RESS. Int. J. Pharm., 252, 225-233.
- Grady L.T., Hays S.E., King R.H., Klein H.R., Mader W.J., Wyatt D.K., Zimmerer R.O., 1973, Drug purity profiles. J. Pharm. Sci., 62, 456-464.
- Greman M., Vrecer F., Meden A., 2002, Some physico-chemical properties of doxazosin mesylate polymorphic forms and its amorphous state. J. Therm. Anal. Calorim., 68, 373-387.
- Grillo D., Polla G., Vega D., 2012, Pharmaceutics, preformulation and drug delivery. Conformational polymorphism on imatinib mesylate: grinding effects. J. Pharm. Sci., 101, 541-551.
- Gupta P., Bansal A.K., 2005, Devitrification of amorphous celecoxib. AAPS Pharm. Sci. Tech., 30, 6, E223-E230.
- Haines P.J. (Ed.), 2002, Principles of Thermal Analysis and Calorimetry. RSC Paperbacks, Cambridge.
- Han J., Gupte S., Suryanarayanan R., 1998, Applications of pressure differential scanning calorimetry in the study of pharmaceutical hydrates. II. Ampicillin trihydrate. Int. J. Pharm., 170, 63-72.

- Han J., Suryanarayanan R., 1997, Applications of pressure differential scanning calorimetry in the study of pharmaceutical hydrates. I. Carbamazepine dihydrate. Int. J. Pharm., 157, 209-218.
- Harding L., Hill S.Q.G., Reading M., Craig D.Q.M., 2008, The development of microthermal analysis and photothermal microspectroscopy as novel approaches to drug-excipient compatibility studies. Int. J. Pharm., 354, 149-157.
- Hatakeyama T., Zhenhai L. (Eds.), 1998, Handbook of Thermal Analysis. Wiley, West Sussex.
- He R., Craig D.Q.M., 2001, An investigation into the thermal behaviour of an amorphous drug using low frequency dielectric spectroscopy and modulated temperature differential scanning calorimetry. J. Pharm. Pharmacol., 53, 41-48.
- Hilfiker R., Berghausen J., Blatter F., Burkhard A., Paul S.M., Freiermuth B., Geoffroy A., Marcolli C., Siebenhaar B., Szelagiewicz M., Vit A., Raumer M., 2003, Polymorphism – integrated approach from high-throughput screening to crystallization optimization. J. Therm. Anal. Calorim., 73, 429-440.
- Hill V.L., Craig D.Q.M., Feely L.C., 1999, The effects of experimental parameters and calibration on MTDSC data. Int. J. Pharm., 192, 21-32.
- Hino T., Ford J.L., Powell M.W., 2001, Assessment of nicotinamide polymorphs by differential scanning calorimetry. Thermochim. Acta, 399, 85-92.
- Höhne G.W.H., Hemminger W., Flammersheim H.J., 1996, Differential Scanning Calorimetry. An Introduction for Practitioners. Springer, Heidelberg.
- Horosanskaia E., Seidel-Morgenstern A., Lorenz H., 2014, Investigation of drug polymorphism: Case of artemisinin. Thermochim. Acta, 578, 74-81.
- Huang Y., Dai W., 2014, Fundamental aspects of solid dispersion technology for poorly soluble drugs. Acta Pharm. Sinica B., 4, 18-25.
- Iijima M., Hatakeyama T., Hatakeyama H., 2005, Swelling behaviour of calcium pectin hydrogels by thermomechanical analysis in water. Thermochim. Acta, 431, 68-72.
- Iijima M., Hatakeyama T., Hatakeyama H., 2012, DSC and TMA studies on freezing and thawing gelation of galactomannan polysaccharide. Thermochim. Acta, 532, 83-87.
- Iijima M., Hatakeyama T., Hatakeyama H., 2013, Gelation of cassia gum by freezing and thawing. J. Therm. Anal. Calorim., 113, 1073-1078.
- Iijima M., Hatakeyama T., Takahashi M., Hatakeyama H., 2001, Thermomechanical analysis of polysaccharide hydrogels in water. J. Therm. Anal. Calorim., 64, 617-627.
- Johansson J., Pettersson S., Taylor L.S., 2002, Infrared imaging of laser-induced heating during Raman spectroscopy of pharmaceutical solids. J. Pharm. Biomed. Anal., 30, 1223-1231.
- Johari G.P., Kim S., Shanker R.M., 2007, Dielectric relaxation and crystallization of ultraviscous melt and glassy state of aspirin, ibuprofen, progesterone, and quinidine. J. Pharm. Sci., 96, 1159-1175.
- Jones D.S., Tian Y., Abu-Diak O., Andrews G.P., 2012, Pharmaceutical applications of dynamic mechanical thermal analysis. Adv. Drug Deliv. Rev., 64, 440-448.
- Kamboj S., Kamboj N., Rawal R.K., Thakkar A., Bhardhwaj T.R., 2014, A compendium of techniques for the analysis of pharmaceutical impurities. Curr. Pharm. Anal., 10, 145-160.
- Karataş A., Bekmezci Ş., 2013, Evaluation and enhancement of physical stability of semi-solid dispersions containing piroxicam into hard gelatine capsules. Acta Pol. Pharm. Drug Res., 70, 883-897.
- Karolewicz B., Górniak A., Owczarek A., Nartowski K., Żurawska-Płaksej E., Pluta J., 2012a, Solid dispersions in pharmaceutical technology. Part II. The methods of analysis of solid dispersions and examples of their application. Polim. Med., 42, 97-107.
- Karolewicz B., Górniak A., Probst S., Owczarek A., Pluta J., Żurawska-Płaksej E., 2012b, Solid dispersions in pharmaceutical technology. Part I. Classification and methods to obtain solid dispersions. Polim. Med., 42, 17-27.
- Kawasumi K., Zhang Q., Segawa Y., Scott L., Itami K., 2013, A grossly warped nanographene and the consequences of multiple odd-membered-ring defects. Nat. Chem., 5, 739-744.
- Kerč J., Srčič S., 1995, Thermal analysis of glassy pharmaceuticals. Thermochim. Acta, 248, 81-95.

- Keymolen B., Ford J.L., Powell M.W., Rajabi-Siahboomi A.R., 2003, Investigation of the polymorphic transformations from glassy nifedipine. Thermochim. Acta, 397, 103-117.
- Khankari R.K., Grant D.J.W., 1995, Pharmaceutical hydrates. Thermochim. Acta, 248, 61-79.
- Kiss D., Zelko R., Novak Cs., Ehen Zs., 2006, Application of DSC and NIRS to study the compatibility of metronidazole with different pharmaceutical excipients. J. Therm. Anal. Calorim., 84, 2, 447-451.
- Kitamura S., Miyamae A., Koda S., Morimoto Y., 1989, Effect of grinding on the solid-state stability of cexfine trihydrate. Int. J. Pharm., 56, 125-134.
- Knopp M.M., Löbmann K., Elder D.P., Rades T., Holm R., 2016, Recent advances and potential applications of modulated differential scanning calorimetry (mDSC) in drug development. Eur. J. Pharm. Sci., 87, 164-173.
- Kocjan R. (Ed.), 2015, Chemia Analityczna. Tom 1 i 2. Wyd. II, PZWL, Warszawa.
- Kogermann K., Veski P., Rantanen J., Naelapaa K., 2011, X-ray powder diffractometry in combination with principal component analysis A tool for monitoring solid state changes. Eur. J. Pharm. Sci., 43, 278-289.
- Kosecka-Judin E., Wesołowski M., Paukszta D., 2012, Pattern recognition methods as the supplementary techniques for identification of salicylamide cyclodextrins inclusion complexes. Central Eur. J. Chem., 10, 1534-1546.
- Kowalska D., 2017, Różnicowa kalorymetria skanningowa DSC, ciśnieniowa różnicowa kalorymetria skanningowa PDSC, StepScan DSC, temperaturowo modulowana DSC, szybka i super szybka DSC w badaniu żywności. ABiD, 128-238
- Krupa A., Majda D., Jachowicz R., Mozgawa W., 2010, Solid-state interaction of ibuprofen and Neusilin US2. Thermochim. Acta, 509, 12-17.
- Lavor E.P., Freire F.D., Aragão C.F.S., Raffin F.N., de Lima e Moura T.F.A., 2012, Application of thermal analysis to the study of anti-tuberculosis drug compatibility. Part 1. J. Therm. Anal. Calorim., 108, 207-212.
- Lee A.Y., Erdemir D., Myerson A.S., 2011, Crystal polymorphism in chemical process development. Ann. Rev. Chem. Biomol. Eng., 2, 259-280.
- Leitao M.L.P., Canotilho J., Cruz M.S.C., Pereira J.C., Sousa A.T., Redinha J.S., 2002, Study of polymorphism from DSC melting curves. Polymorphs of terfenadine. J. Therm. Anal. Calorim., 68, 397-412.
- Lever T., Haines P., Rouquerol J., Charsley E.L., Van Eckern P., Burlett D.J., 2014, ICTAC nomenclature of thermal analysis (IUPAC Recommendations 2014). Pure Appl. Chem., 86, 545-553.
- Lin S.-Y., Wang S.-Y., 2012, Advances in simultaneous DSC-FTIR microspectroscopy for rapid solid-state chemical stability studies: Some dipeptide drugs as examples. Adv. Drug Deliv. Rev., 64, 461-478.
- Lizarraga E., Zabaleta C., Palop J.A., 2007, Thermal stability and decomposition of pharmaceutical compounds. J. Therm. Anal. Calorim., 89, 783-792.
- Lukas K., LeMaire P.K., 2009, Differential scanning calorimetry: Fundamental overview. Resonance, 14, 807-817.
- Łaszcz M., Kosmacińska B., Korczak K., Śmigielska B., Glice., Maruszczak., Groman., Beczkowicz H., Żelazko Ł., 2007, Study on compatibility of imatinib mesylate with pharmaceutical excipients. J. Therm. Anal. Calorim., 88, 305-310.
- Łaszcz M., Trzcińska K, Kubiszewski M., Kosmacińska B., Glice M., 2010, Stability studies and structural characterization of pramipexole. J. Pharm. Biomed. Anal., 53, 1033-1036.
- Łaszcz M., Trzcińska K., Witkowska A., Ciesielska A., Badowska-Rosłonek K., Kuziak K., 2016, Stuctural and physicochemical studies of olopatadine hydrochloride conformational polymorphs. J. Pharm. Sci., 105, 2419-2426.
- Łaszcz M., Trzcińska, K. Filip, Szyprowska A., Mucha M, Krzeczyński P., 2011, Stability studies of capecitabine. J. Therm. Anal. Calorim., 105, 1015-1021.
- Łaszcz M., Witkowska A., 2016, Studies of phase transitions in the aripiprazole solid dosage form. J. Pharm. Biomed. Anal., 117, 298-303.
- Ma K., Wang H., Zhao M., Xing J., 2009, Purity determination and uncertainty evaluation of theophylline by mass balance method, high performance liquid chromatography and differential scanning calorimetry. Anal. Chim. Acta, 650, 227-233.

- Maheswaram M.P., Mantheni D., Perera I., Venumuddala H., Riga A., Alexander K., 2013, Characterization of crystalline and amorphous content in pharmaceutical solids by dielectric thermal analysis. J. Therm. Anal. Calorim., 111, 1987-1997.
- Malcolm R.K., McCullagh S., Woolfson A.D., Catney M., Tallon P., 2002, A dynamic mechanical method for determining the silicone elastomer solubility of drugs and pharmaceutical excipients in silicone intravaginal drug delivery rings. Biomaterials, 23, 3589-3594.
- Mallet F., Petit S., Lafont S., Billot P., Lemarchand D., Coquerel G., 2003, Solvent exchanges among molecular compounds. Two extreme cases of pharmaceutical interest. J. Therm. Anal. Calorim., 73, 459-471.
- Malpezzi L., Fuganti C., Maccaroni E., Masciocchi N., Nardi A., 2010, Thermal and structural characterization of two polymorphs of Atovaquone and of its chloro derivative. J. Therm. Anal. Calorim., 102, 203-210.
- Manduva R., Kett V.L., Banks S.R., Wood J., Reading M., Craig D.Q.M., 2008, Calorimetric and spatial characterization of polymorphic transitions in caffeine using quasi-isothermal MTDSC and localized thermomechanical analysis. J. Pharm. Sci., 97, 1285-1300.
- Maria T.M.R., Castro R.A.E., Silva M.R., Ramos M.L., Justino L.L.G., Burrows H.D., Canotilho J., Eusébio M.E., 2013, Polymorphism and melt crystallisation of racemic betaxolol, a β-adrenergic antagonist drug. J. Therm. Anal. Calorim., 111, 2171-2178.
- Marini A., Berbenni V., Bruni G., Giordano F., Villa M., 1996, Dehydration of β-cyclodextrin: facts and opinions. Thermochim. Acta, 279, 27-33.
- Marti E.E., 1972, Purity determination by differential scanning calorimetry. Thermochim. Acta, 5, 173-220.
- Mathkar S., Kumar S., Brystol A., Olawoore K., Min D., Markovich R., Rustum A., 2009, The use differential scanning calorimetry for the purity verification of pharmaceutical reference standards. J. Pharm. Biomed. Anal., 49, 627-631.
- Matos A.P.S., Costa J.S., Boniatti J., Seiceira R.C., Pitaluga A., Oliveira D.L., Vicosa A.L., Holandino C., 2017, Compatibility study between diazepam and tablet excipients. Infrared spectroscopy and thermal analysis in accelerated stability conditions. J. Therm. Anal. Calorim., 127, 1675-1682.
- McDaid F.M., Barker S.A., Fitzpatrick S., Petts C.R., Craig D.Q.M., 2003, Further investigations into the use of high sensitivity differential scanning calorimetry as a means of predicting drug-excipient interactions. Int. J. Pharm., 252, 235-240.
- McGregor C., Saunders M.H., Buckton G., Saklatvala R.D., 2004, The use of high-speed differential scanning calorimetry (Hyper-DSC<sup>TM</sup>) to study the thermal properties of carbamazepine polymorphs. Thermochim. Acta, 417, 231-237.
- McMahon G., 2007, Analytical Instrumentation. A Quide to Laboratory, Portable and Miniaturized Instruments. Wiley, Chichester.
- Mohamed M.A., Attia A.K., 2017, Thermal behavior and decomposition kinetics of cinnarizine under isothermal and non-isothermal conditions. J. Therm. Anal. Calorim., 127, 1751-1756.
- Moreno-Molek S., Saleh S., Mantheni D.R., Maheswaram M.P.K., Sam-Yellowe T., Riga A.T., 2012, Predicting interactive behaviour of cytokines and their receptors by dielectric thermal analysis and thermogravimetry. J. Therm. Anal. Calorim., 108, 79-85.
- Mura P., Maestrelli F., Cirri M., Furlanetto S., Pinzauti S., 2003, Differential scanning calorimetry as an analytical tool in the study of drug-cyclodextrin interactions. J. Therm. Anal. Calorim., 73, 635-646.
- Nagpal S., Upadhyay A., Bhardhwaj T.R., Thakkar A., 2011, A review on need and importance of impurity profiling. Curr. Pharm. Anal., 7, 62-70.
- Narang A.S., Desai D., Badawy S., 2012, Impact of excipient interactions on solid dosage form stability. Pharm. Res., 29, 2660-2683.
- Narsai K., De Villiers M.M., Du Plessis J., 1997, Preformulation study using differential scanning calorimetry to determine the compatibility of α-hydroxy acids. Pharmazie, 52, 405-406.
- Nayak T., Patra S., 2012, Stable polymorph of quetiapine fumarate form II. J. Pharm. Res., 5, 4318-4319.
- Nemet Z., Hegedus B., Szantay C., Sztatisz J., Pokol G., 2005, Pressurization effects on the polymorphic forms of famotidine. Thermochim. Acta, 430, 35-41.

- Nep E.I., Conway B.R., 2012, Preformulation studies on grewia gum as a formulation excipient. J. Therm. Anal. Calorim., 108, 197-205.
- Nicolai B., Ceolin R., Rietveld I.B., 2010, Polymorphism and solvation of indomethacin. Characterization of an indomethacin-tetrahydrofuran solvate leading to phase I. J. Therm. Anal. Calorim., 102, 211-216.
- Nishath F., Tirunagari M., Husna K.Q., Nandagopal A., Jangala V.R., 2011, Drug-excipient interaction and its importance in dosage form development. J. App. Pharm. Sci., 1, 66-71.
- Oguchi T., Sasaki N., Hara T., Tozuka Y., Yamamoto K., 2003, Differential thermal crystallization from amorphous chenodeoxycholic acid between the ground specimens derived from the polymorphs. Int. J. Pharm., 253, 81-88.
- Oliveira G.G.G., Feitosa A., Loureiro K., Fernandes A.R., Souto E.B., Severino P., 2017, Compatibility study of paracetamol, chlorpheniramine maleate and phenylephrine hydrochloride in physical mixtures. Saudi Pharm. J., 25, 99-103.
- Osman Z., 2012, Thermomechanical analysis of the tannins of *Acacia Nilotica* spp. Nilotica as a rapid tool for the evaluation of wood-based adhesives. J. Therm. Anal. Calorim., 107, 709-716.
- Pal S., Kim B.K., Kim W.Y., Kim M.J., Ki H.A., Lee K.H., Kang W.S., Kang I.H., Kang S.I., Song J.M., 2009, Identification of γ-ray irradiated medicinal herbs using pulsed photostimulated luminescence, thermoluminescence, and electron spin resonsnce spectroscopy. Anal. Bioanal. Chem., 349, 1931-1945.
- Panagopoulou-Kaplani A., Malamataris S., 2000, Preparation and characterization of a new insoluble polymorphic form of glibenclamide. Int. J. Pharm., 195, 239-246.
- Pani N.R., Nath L.K., Acharya S., Bhuniya B., 2012, Application of DSC, IST, and FT-IR study in the compatibility testing of nateglinide with different pharmaceutical excipients. J. Therm. Anal. Calorim., 108, 219-226.
- Pfeffer-Henning S., Piechon P., Bellus M., Goldbronn C., Tedesco E., 2004, Physico-chemical characterization of an active pharmaceutical ingredient. Crystal polymorphism and structural analysis. J. Therm. Anal. Calorim., 77, 663-679.
- Pielichowski K., 2009, Dynamiczna analiza mechaniczna (DMA). Laboratorium, Przegląd Ogólnopolski, 11-12, 50-52.
- Pielichowski K., Flejtuch K., 2002, Zastosowanie modulowanej różnicowej kalorymetrii skaningowej (MDSC) w badaniach właściwości polimerów. Polimery, 47, 784-792.
- Pindelska E., Sokal A., Kolodziejski W., 2017, Pharmaceutical cocrystals, salts and polymorphs: Advanced characterization techniques. Adv. Drug Deliv. Rev., 117, 111-146.
- Plano D., Lizarraga L., Palop J.A., Sanmartín C., 2011, Study of polymorphism of organosulfur and organoselenium compounds. J. Therm. Anal. Calorim., 105, 1007-1013.
- Plato C., 1972, Differential scanning calorimetry as a general method for determining the purity and heat of fusion of high-purity organic chemicals. Application to 64 compounds. Anal. Chem., 44, 1531-1534.
- Plato C., Glasgow A.R., 1969, Differential scanning calorimetry as a general method for determining the purity and heat of fusion of high-purity organic chemicals. Application to 95 compounds. Anal. Chem., 41, 330-336.
- Podczeck F., Almeida S.M., 2002, Determination of the mechanical properties of pellets and film coated pellets using dynamic mechanical analysis (DMA). Eur. J. Pharm. Sci., 16, 209-214.
- Polla G.I., Vega D.R., Lanza H., Tombari D.G., Baggio R., Ayala A.P., Filho J.M., Fernádez D., Leyva G., Dartayet G., 2005, Thermal behavior and stability in olanzapine. Int. J. Pharm., 301, 33-40.
- Poradnik Fizykochemiczny, 1974, Wyd. II, WNT, Warszawa.
- Price D.M., Reading M., Hammiche A., Pollock H.M., 2000, New adventures in thermal analysis. J. Therm. Anal. Calorim., 60, 723-733.
- Procópio J.V.V., de Souza V.G., da Costa R.A., Correia L.P., de Souza F.S., Macêdo R.U., 2011, Application of thermal analysis and pyrolysis coupled to GC/MC in the qualification of simvastatin pharmaceutical raw material. J. Therm. Anal. Calorim., 106, 665-670.
- Ramos L.A., Cavalheiro É.T.G., 2007, Thermal behavior of loratadine. J. Therm. Anal. Calorim., 87, 831-834.

- Rojek B., Suchacz B., Wesołowski M., 2018, Artificial neural networks as a supporting tool for compatibility study based on thermogravimetric data. Thermochim. Acta, 659, 222-231.
- Rojek B., Wesołowski M., 2016, Fourier transform infrared spectroscopy supported by multivariate statistics in compatibility study of atenolol with excipients. Vib. Spectr., 86, 190-197.
- Rojek B., Wesołowski M., 2017, Compatibility studies of hydrocortisone with excipients using thermogravimetric analysis supported by multivariate statistical analysis. J. Therm. Anal. Calorim., 127, 543-553.
- Rojek B., Wesołowski M., 2019, FTIR and TG analyses coupled with factor analysis in a compatibility study of acetazolamide with excipients. Spectrochim. Acta, Part A, 208, 285-293.
- Rojek B., Wesołowski M., Suchacz B., 2013, Detection of compatibility between baclofen and excipients with aid of infrared spectroscopy and chemometry. Spectrochim. Acta, Part A, 116, 532-538.
- Rollinger J.M., Burger A., 2002, Physico-chemical characterization of hydrated and anhydrous crystal forms of amlodipine besylate. J. Therm. Anal. Calorim., 68, 361-372.
- Roumeli E., Tsiapranta A., Pavlidou E., Vourlias G., Kachrimanis K., Bikiaris D., Chrissafis K., 2013, Compatibility study between trandolapril and natural excipients used in solid dosage forms. J. Therm. Anal. Calorim., 111, 2109-215.
- Rowe R.C., Sheskey P.J., Quinn M.E., 2009, Handbook of pharmaceutical excipients. 6th ed., Pharmaceutical Press and American Pharmacists Association, London.
- Royall P.G., Craig D.Q.M., Price D.M., Reading M., Lever T.J., 1999, An investigation into the use of microthermal analysis for the solid state characterisation of an HPMC tablet formulation. Int. J. Pharm., 192, 97-103.
- Ruiz M.A., Reyes I., Parera A., Gallardo V., 1998, Determination of the stability of omeprazole by means of differential scanning calorimetry. J. Therm. Anal., 51, 29-35.
- Rustuichelli C., Gamberini G., Ferioli V., Gamberini M.C., Ficarra R., Tommasini S., 2000, Solid-state study of polymorphic drugs: carbamazepine. J. Pharm. Biomed. Anal., 23, 41-54.
- Saganowska P., Wesołowski M., 2017, Principal component and cluster analyses as supporting tools for cocrystals detection. J. Therm. Anal. Calorim., 130, 45-55.
- Saganowska P., Wesołowski M., 2018, DSC as a screening tool for rapid co-crystal detection in binary mixtures of benzodiazepines with co-formers. J. Therm. Anal. Calorim., 133, 785-795.
- Saifee M., Inamdar N., Dhamecha D.L., Rathi A.A., 2009, Drug polymorphism: A review. Int. J. Health Res., 2009, 2, 291-306.
- Saleh S., Mantheni D.R., Maheswaram M.P.K., Moreno-Molek S., Sam-Yellowe T., Riga A.T., 2013, Human cytokines characterized by dielectric thermal analysis, thermogravimetry, and differential scanning calorimetry. J. Therm. Anal. Calorim., 111, 1707-1716.
- Saleh S.W., Moreno-Molek S.E., Mantheni D.R., Maheswaram M.P.K., Sam-Yellowe T., Riga A.T., 2012, Thermal behaviour and signature patterns of human cytokine and soluble cytokine receptors investigated using dielectric thermal analysis and thermogravimetry. J. Therm. Anal. Calorim., 108, 41-51.
- Sasic S, Ozaki Y, editors. Raman, infrared and near-infrared chemical imaging. Hoboken: Wiley; 2010.
- Sathisaran I., Dalvi S.V., 2018, Engineering cocrystals of poorly water-soluble drugs to enhance dissolution in aqueous medium. Pharm., 10,1-74.
- Saunders M., 2008, Thermal analysis of pharmaceuticals, in: Gabbott P. (Ed.), Principles and Applications of Thermal Analysis. Blackwell Publishing, Oxford, pp. 286-329.
- Schmidt A.C., 2005, Structural characteristics and crystal polymorphism of three local anaesthetic bases. Crystal polymorphism of local anaesthetic drugs: Part VII. Int. J. Pharm., 298, 186-197.
- Schmidt A.C., Senfter N., Griesser U.J., 2003, Crystal polymorphism of local anaesthetic drugs. Part I: Pramocaine base in comparison with pramocaine hydrochloride. J. Therm. Anal. Calorim., 73, 397-408.
- Schmitt E.A., Peck K., Sun Y., Geoffroy J.-M., 2001, Rapid, practical and predictive excipient compatibility screening using isothermal microcalorimetry. Thermochim. Acta, 380, 175-183.

- Serajuddin A.T.M., 1986, Comparative thermal properties of the monohydrates of sodium theophylline and theophylline. J. Pharm. Pharmacol., 38, 93-96.
- Shantikumar S., Sreekanth G., SurendraNath K.V., JaferValli S., Satheeshkumar N., 2014, Compatibility study between sitagliptin and pharmaceutical excipients used in solid dosage forms. J Therm. Anal. Calorim., 115, 2423-2428.
- Sichina W.J., 2001, Characterization of pharmaceuticals using thermal analysis. Am. Lab., 33, 16-25.
- Sienko M.J., Plane R.A., 1996, Chemia. Podstawy i zastosowania. Wyd. IV, WNT, Warszawa.
- Silva I.A., Sa-Berreto L.C.L., Lima E. M., Cunha-Filho M.S.S., 2014, Preformulation studies of itraconazole associated with benznidazole and pharmaceutical excipients. Thermochim. Acta, 575, 29-33.
- Silverstein R.M., Webster F.X., Kiemle D.J., 2007, Spektroskopowe metody identyfikacji związków organicznych. PWN, Warszawa.
- Simon P., Veverka M., Okuliar J., 2004, New screening method for the determination of stability of pharmaceuticals. Int. J. Pharm., 270, 21-26.
- Sipos P., Szucs M., Szabo A., Eros I., Szabo-Revesz P., 2008, An assessment of the interactions between diclofenac sodium and ammonio methacrylate copolymer using thermal analysis and Raman spectroscopy. J. Pharm. Biomed. Anal., 46, 288-294.
- Skoog D. A., West D. M., Holler F. J., Crouch S.R., 2007, Podstawy Chemii Analitycznej. Tom 1 i 2, PWN, Warszawa.
- Soutari N., Buanz A.B.M., Gul M.O., Tuleu C., Gaisford S., 2012, Quantifying crystallisation rates of amorphous pharmaceuticals with dynamic mechanical analysis (DMA). Int. J. Pharm., 423, 335-340.
- Steger, N.; Aucamp, M.; Zhang, S-W.; de Villiers, M.M., 2012, Hot-stage optical microscopy as an analytical tool to understand solid-state changes in pharmaceutical materials. Am. Pharm. Rev., posted March 1.
- Stoch L., 1998, Przegląd metod analizy termicznej. Materiały Konferencyjne II Szkoły Analizy Termicznej SAT'98, Zakopane.
- Stodghill S.P., 2010, Thermal analysis. A review of techniques and applications in the pharmaceutical sciences. Am. Pharm. Rev., 13.
- Sykuła A., Łodyga-Chruścińska E., Zakrzewski M., 2006, Polimorfizm jego wpływ na substancje farmaceutyczne. Z. Nauk. Pol. Łódz., Chem. Spoż. Biotechnol., 984, 93-106.
- Szczepaniak W., 2012, Metody Instrumentalne w Analizie Chemicznej. Wyd. V, PWN, Warszawa.
- Szeleszczuk Ł., Pisklak D.M., Zielińska-Pisklak M., Jurczak E., 2019, A new polymorph of 17-β-estradiol and application of different analytical techniques (ssNMR, PXRD, DSC, and FTIR) in its study. Journal of Molecular Structure, 1183, 274-280.
- Szynkaruk P., Wesołowski M., Samson-Rosa M., 2010, Principal component analysis of thermal decomposition of magnesium salts used as drugs. J. Therm. Anal. Calorim., 101, 505-512.
- Terada K., Masuda T., Yoshihashi Y., Yonemochi E., 2006, Application of microcalorimetry to the formulation study. J. Therm. Anal. Calorim., 85, 675-680.
- Thakur S.S., Maheswaram M.P.K., Mantheni D.R., Kaza L., Perara I., Ball D.W., Moran J., Riga A.T., 2012, Solidstate mechanical properties of crystalline drugs and excipients. J. Therm. Anal. Calorim., 108, 283-287.
- Tian B., Wang X., Zhang Y., Zhang K., Zhang Y., Tang X., 2015, Theoretical prediction of a phase diagram for solid dispersions. Pharm. Res., 32, 840-851.
- Tkachenko M.L., Zhnyakina L.E., Kosmynin A.S., 2003, Physicochemical investigation of paracetamol-caffeine solid mixtures. Pharm. Chem. J., 37, 430-432.
- Tomassetti M., Catalani A., Rossi V., Vecchio S., 2005, Thermal analysis study of the interactions between acetaminophen and excipients in solid dosage forms and in some binary mixtures. J. Pharm. Biomed. Anal., 37, 949-955.
- Veiga A., Oliveira P.R., Bernardi L.S., Mendes C., Silva M.A.S., Sangoi M.S., Janissek P.R., Murakami F.S., 2018, Solid-state compatibility studies of drug without melting point. J. Therm. Anal. Calorim., 131, 3201-3209.

- Verdonck E., Schaap K., Thomas. L.C., 1999, A discussions of the principles and applications of modulated temperature DSC (MTDSC). Int. J. Pharm., 192, 3-20.
- Verma R.K., Garg S., 2005, Selection of excipients for extended release formulations of glipizide trough drugexcipient compatibility testing. J. Pharm. Biomed. Anal., 38, 633-644.
- Vitez I.M., Newman A.W., Davidovich M., Kiesnowski Ch., 1998, The evolution of hot stage microscopy to aid solid-state characterizations of pharmaceutical solids. Thermochim. Acta, 324, 187-196.
- Vrecer F., Vrbinc M., Meden A., 2003, Characterization of piroxicam crystal modifications. Int. J. Pharm., 256, 3-15.
- Waterman K.C., Adami R.C., 2005, Accelerated aging: Prediction of chemical stability of pharmaceuticals. Int. J. Pharm., 293, 101-125.
- Wesołowski M., 1985, Thermal methods of analysis in solid dosage technology. Drug Dev. Ind. Pharm., 11, 493-521.
- Wesołowski M., 1992a, Thermoanalytical methods in pharmaceutical technology. J. Therm. Anal., 38, 2239-2245.
- Wesołowski M., 1992b, Analysis of drug formulations by thermal decomposition. Thermochim. Acta 209, 223-251.
- Wesołowski M., 2000, Polimorfizm substancji leczniczych. Fizykochemiczne metody badania. Farm. Pol., 56, 3-20.
- Wesołowski M., 2003, Różnicowa analiza termiczna (DTA) i różnicowa kalorymetria skaningowa (DSC) w analizie czystości substancji leczniczych. Farm. Pol., 59, 105-114.
- Wesołowski M., Erecińska J., 2005, Relation between chemical structure of amino acids and their thermal decomposition. Analysis of the data by principal component analysis. J. Therm. Anal. Calorim., 82, 307-313.
- Wesołowski M., Erecińska J., 2012, Pattern recognition methods in the study of thermal decomposition of α-amino acids. J. Therm. Anal. Calorim., 109, 585-593.
- Wesołowski M., Kosecka E., Erecińska J., Kobyłczyk K., 2003, The influence of chemical structure of sulfonamides on the course of their thermal decomposition. J. Therm. Anal. Calorim., 74, 465-476.
- Wesołowski M., Leyk E., Szynkaruk P., 2014, Detection of magnesium compounds in dietary supplements and medicinal products by DSC, Infrared and Raman techniques. J. Therm. Anal. Calorim., 116, 671-680.
- Wesołowski M., Rojek B., 2013, Thermogravimetric detection of incompatibilities between atenolol and excipients using multivariate techniques. J. Therm. Anal. Calorim., 113, 169-177.
- Wesołowski M., Rojek B., Piotrowska J., 2012a, Application of chemometrically processed thermogravimetric data for identification of baclofen-excipient interactions. J. AOAC Int., 95, 691-698.
- Wesołowski M., Szynkaruk P., 2001, Thermal decomposition of purine derivatives used in medicine. J. Therm. Anal. Calorim., 65, 599-605.
- Wesołowski M., Szynkaruk P., 2008, Thermal decomposition of methylxanthines: Interpretation of the results by PCA. J. Therm. Anal. Calorim., 93, 739-746.
- Wesołowski M., Szynkaruk P., Makurat E., 2012b, DSC and IR as supporting tools for identification of methylxanthines in solid dosage forms of drugs. J. Therm. Anal. Calorim., 109, 807-815.
- Wesołowski M., Teodorczyk J., 1987, Thermal decomposition of silicon derivatives of cinchocaine. Thermochim. Acta, 116, 79-84.
- Zhang J., Michniak-Kohn B., 2011, Investigation of microemulsion microstructures and their relationship to transdermal permeation of model drugs: Ketoprofen, lidocaine, and caffeine. Int. J. Pharm., 421, 34-44.
- Zhao Y., Inbar P., Chokshi H.P., Malick A.W., Choi D.S., 2011, Prediction of the thermal phase diagram of amorphous solid dispersions by Flory-Huggins theory. J. Pharm. Sci., 100, 3196-3207.

### STRESZCZENIE

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

### ABSTRACT

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

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

Realizing this aim of studies it was checked the possibility to apply selected techniques for confirmation of presence of a drug substance in a pharmaceutical product containing this substance and several or more excipients. The investigations were enlarged into analysis of pharmaceutical products manufactured by different firms, but having the same active ingredient at various amounts. In this way it was possible to evaluate the impact of excipients, their types and quantities, on possibility to confirm the presence of an active ingredient in a pharmaceutical product, as well as determination, in which degree the selected thermal and spectroscopic techniques can be useful for composition evaluation of available in pharmaceutical turnover products and dietary supplements.

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

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

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

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

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

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

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

# Wykaz osiągnięć w pracy naukowo-badawczej

## A. Artykuły w czasopismach indeksowanych na liście JCR:

1. Wesołowski M., Leyk E., Szynkaruk P., 2014, Detection of magnesium compounds in dietary supplements and medicinal products by DSC, Infrared and Raman techniques. Journal of Thermal Analysis and Calorimetry, 116, 671-680. (IF = 2,206)

https://link.springer.com/article/10.1007/s10973-014-3762-y

2. Wesołowski M., Szynkaruk P., Makurat E., 2012, DSC and IR as supporting tools for identification of methylxanthines in solid dosage forms of drugs. Journal of Thermal Analysis and Calorimetry 109, 807-815. (IF = 1,982)

https://link.springer.com/article/10.1007/s10973-012-2294-6

3. Szynkaruk P., Wesołowski M., Samson-Rosa M., 2010. Principal component analysis of thermal decomposition of magnesium salts used as drugs. Journal of Thermal Analysis and Calorimetry, 101, 505-512. (IF = 1.752)

https://link.springer.com/article/10.1007/s10973-010-0830-9

4. Wesołowski M., Szynkaruk P., 2008, Thermal decomposition of methylxanthines: Interpretation of the results by PCA. Journal of Thermal Analysis and Calorimetry, 93, 739-746. (IF = 1,630)

https://link.springer.com/article/10.1007/s10973-008-9138-4

5. Wesołowski M., Szynkaruk P., 2001, Thermal decomposition of purine derivatives used in medicine. Journal of Thermal Analysis and Calorimetry, 65, 599-605. (IF = 0,545)

https://link.springer.com/article/10.1023/A%3A1017962027407

## B. Streszczenia zamieszczone w materiałach z konferencji międzynarodowych

- 1. Wesołowski M., Leyk E., Szynkaruk P., 2013, DSC and IR as supplementary techniques for identification of magnesium salts in medicinal products and dietary supplements. 4th Joint Czech-Hungarian-Polish-Slovak Thermoanalytical Conference, Pardubice (Czech Republic), June 24-27, 2013. Book of contributions, PO-47, S. 259-260.
- Wesołowski M., Makurat E., Szynkaruk P., 2012, DSC and IR as supplementary techniques for identification of magnesium salts in drug forms and dietary supplements. 11th Conference on Calorimetry and Thermal Analysis, CCTA 11, Zakopane, September 9-13, 2012. Book of abstracts, OMP-P14, S. 158.
- Wesołowski M., Szynkaruk P., Makurat E., 2011, DSC and IR as supporting tools for identity confirmation of methylxanthines in solid dosage forms of drugs. 10th International Seminar on Thermal Analysis and Calorimetry to the memory of Prof. St. Bretsznajder, Płock, 29-30 September 2011, Seminar materials, R-11, S. 32-33.
- 4. Szynkaruk P., Wesołowski M., 2009, Thermal decomposition of magnesium salts. Interpretation of the results by chemometric methods. CCTA 10, 10th Conference on Calorimetry and Thermal Analysis of PTKAT joint with 2nd Czech-Hungarian-Polish-Slovakian Thermoanalytical Conference, Zakopane, August 30 to September 3, 2009. Abstracts, II-P-29, S. 108.

- 5. Wesołowski M., Szynkaruk P., Tubaja A., 2005, Thermal decomposition of xanthine derivatives. Interpretation of results by principal component analysis. European Conference on Calorimetry and Thermal Analysis for Environment, ECCTAE 2005, Zakopane, September 6-11, 2005. Abstracts, PSI-P-18, S. 71.
- 6. Wesołowski M., Szynkaruk P., 2000, Thermal decomposition of purine derivatives used in the medicine. 8th Conference on Calorimetry and Thermal Analysis of PTKAT (CCTA 8) and International Symposium on Thermodynamics and Structure of Liquids, Zakopane, September 3-8, 2000. Abstracts, III-P10, S. 147-148.

## C. Streszczenia zamieszczone w materiałach z konferencji krajowych

- 1. Szynkaruk P., Makurat E., Wesołowski M., 2011, DSC, FT-IR i spektroskopia Ramana w identyfikacji składu produktów leczniczych zawierających metyloksantyny. II Ogólnopolskie Sympozjum Naukowe nt. "Ocena jakości produktów farmaceutycznych z uwzględnieniem metod badania w fazie stałej", Gdańsk, 15-16 września 2011, Materiały zjazdowe, P-13, S. 49.
- Szynkaruk P., Wesołowski M., 2010, Rozkład termiczny organicznych soli magnezu. Ogólnopolska Konferencja Naukowa nt. "Postęp w ocenie jakości substancji i produktów leczniczych", Poznań, 17-18 czerwca 2010. Materiały zjazdowe, P-50, S. 90.
- 3. Szynkaruk P., Wesołowski M., 2009, Analiza termiczna soli magnezu wybranych kwasów organicznych. XXIII Sesja Naukowa Wydziału Farmaceutycznego AMG nt. "Wydział Farmaceutyczny AMG w obszarach badawczych: farmacja, kosmetyki, biotechnologia", Gdańsk, 21-22 maja 2009. Program i streszczenia, P-23, S. 74.
- 4. Wesołowski M., Szynkaruk P., 2008, Rozkład termiczny soli magnezu stosowanych w lecznictwie. Ogólnopolskie Sympozjum Naukowe nt. Ocena jakości produktów farmaceutycznych z uwzględnieniem metod badania w fazie stałej, Gdańsk, 18-19 września 2008. Materiały zjazdowe, P-15, S. 47.
- Wesołowski M., Szynkaruk P., 2007, Thermal decomposition of methylxanthines. Interpretation of the results by principal component analysis. VIII Krajowe Seminarium im. Prof. St. Bretsznajdera, Płock, 19-20 września 2007. W: Materiały IX Krajowego Seminarium im. Prof. St. Bretsznajdera. Politechnika Warszawska, Płock 2007, S. 480-484.
- Wesołowski M., Szynkaruk P., 2002, Charakterystyka rozkładu termicznego pochodnych metyloksantyny przy użyciu analizy termicznej i głównych składowych. VIII Krajowe Seminarium im. Prof. St. Bretsznajdera, Płock, 19-20 września 2002. W: Materiały VIII Krajowego Seminarium im. Prof. St. Bretsznajdera. Politechnika Warszawska, Płock 2002, S. 182-186.
- Wesołowski M., Szynkaruk P., 2001, Ocena trwałości metyloksantyn stosowanych w lecznictwie na podstawie ich rozkładu termicznego. XVIII Naukowy Zjazd Polskiego Towarzystwa Farmaceutycznego nt. Farmacja w XXI wieku, Poznań, 19-22 września 2001. Streszczenia, tom I, PR.I, P-49, S. 76.
- Wesołowski M., Szynkaruk P., Samson-Rosa M., 2001, Wpływ budowy chemicznej na trwałość i rozkład termiczny soli magnezu stosowanych w lecznictwie. XVIII Naukowy Zjazd Polskiego Towarzystwa Farmaceutycznego nt. Farmacja w XXI wieku, Poznań, 19-22 września 2001. Streszczenia, tom I, PR.I, P-49, S. 75.

- Wesołowski M., Szynkaruk P., 1999, Rozkład termiczny pochodnych metyloksantyny. XLII Zjazd Naukowy Polskiego Towarzystwa Chemicznego i Stowarzyszenia Inżynierów i Techników Przemysłu Chemicznego, Rzeszów, 6-10 września 1999. Streszczenia prac, S-1, K-6.
- 10. Wesołowski M., Szynkaruk P., 1998, Rozkład termiczny teofiliny i niektórych jej pochodnych. VII Krajowe Seminarium im. Prof. St. Bretsznajdera, Zakopane, 7-11 września 1998. Materiały seminaryjne, P-40, S. 371.

## D. Pozostałe prace nie związane z tematem rozprawy doktorskiej

- 1. Szynkaruk P., 2001, *Helicobacter Pylori* Źródło zakażeń i diagnostyka. Farmacja Polska, 57, 521-524.
- 2. Szynkaruk P., 2002, Leki stosowane w chorobach związanych z nadmiernym wydzielaniem kwasu solnego. Farmacja Polska, 58, 675-683.