Zastosowanie termogravimetrii oraz TLC w połączeniu z densytometrią w analizie kwasu nikotynowego i jego pochodnych

Wioletta Parys, Alina Pyka-Pająk

Zakład Chemii Analitycznej Katedry Chemii Ogólnej i Analitycznej, Wydział Nauk Farmaceutycznych w Sosnowcu, Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach

ORCID: 0000-0002-1916-1096 (W.P.), 0000-0003-2672-7489 (A.P.P)

Adres do korespondencji: Alina Pyka-Pająk, Zakład Chemii Analitycznej Katedry Chemii Ogólnej i Analitycznej, Wydział Nauk Farmaceutycznych, Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach, ul. Jagiellońska 4, 41-200, Sosnowiec, e-mail: apyka@sum.edu.pl

Wstęp

Witamina PP, nazywana również niacyną, obejmuje dwa związki: kwas nikotynowy oraz nikotynamid, czyli substancje biologicznie czynne usuwające przyczynę i objawy pelagry, zwanej również rumieniem lombardzkim lub chorobą 3D. Pelagra spowodowana jest brakiem witamin, zwłaszcza B₃. Chociaż choroba stała się rzadka w krajach rozwiniętych, pozostaje endemiczna w krajach słabo rozwiniętych [1]. Pelagra jest powszechna u osób, które najczęściej spożywają kukurydzę [2], a także u osób niedożywionych i cierpiących na chorobę alkoholową [3]. Ponadto, innymi czynnikami ryzyka prowadzącymi do niedoboru witaminy B₃ jest anoreksja nerwowa [4], AIDS [5], rak [6] i chemioterapia [7], a także zaburzenia złego wchłaniania, takie jak choroba Leśniowskiego-Crohna [8].

Estry kwasu nikotynowego, takie jak nikotynian metylu oraz nikotynian heksylu znalazły zastosowanie w przemyśle farmaceutycznym jako składniki maści i kremów. Estry te ułatwiają penetrację leku przez skórę [9-13].

Analiza termogravimetryczna (ang. *Thermogravimetric Analysis*, TGA) należy do metod analizy termicznej, w której określa się zmiany masy badanej próbki, gdzie zmiany masy są wynikiem zadanego reżimu temperaturowego. W metodzie tej mierzy się masę próbki w funkcji temperatury [14-16].

Metody termoanalityczne znalazły szerokie zastosowanie w badaniu trwałości i rozkładu termicznego substancji leczniczych [17-19]. Poznanie

Application of thermogravimetry and TLC combined with densitometry in analysis of nicotinic acid and its derivatives

The aim of study was nicotinic acid, nicotinamide, methyl nicotinate and hexyl nicotinate. Thermogravimetric analysis and TLC combined with densitometry were used to assess the stability of nicotinic acid and its derivatives. Thermogravimetric analysis was performed with a Perkin Elmer thermogravimeter and heat from 25°C to 700°C at 20°C min⁻¹. The chemical stability of nicotinic acid and its derivatives in ethanolic solutions stored for 2 years at 8°C were examined by TLC combined with densitometry. Based on thermogravimetric analysis, there was no total loss of nicotinic acid (remains at 5% level) and nicotinamide (remains at 4% level). However, the total loss of methyl nicotinate occurred at 149.5°C, and hexyl nicotinate occurred at 392.2°C, respectively. The densitometric and spectrodensitometric analyses performed showed that methyl nicotinate and hexyl nicotinate undergo a chemical changes during the 2-years of storage in an ethanolic solutions at 8°C. Nicotinic acid and nicotinamide are more stable compounds in relation to methyl nicotinate and hexyl nicotinate.

Keywords: thermogravimetry, TLC, densitometry, stability, nicotinic acid derivatives.

© Farm Pol, 2019, 75(9): 481-485

charakterystyki termicznej związku chemicznego, tzn. jego zachowania się w różnych temperaturach, jest zagadnieniem bardzo ważnym zarówno z punktu widzenia charakterystyki fizykochemicznej badanej substancji, jak i technologii postaci leku. Określenie zakresu temperatur, na których działanie substancja lecznicza może być narażona bez

groźby wystąpienia niekorzystnych zmian w jej strukturze i działaniu farmakoterapeutycznym, jest istotne ze względu na warunki jej przechowywania i obróbki technologicznej.

Celem niniejszej pracy było zastosowanie termogravimetrii oraz TLC w połączeniu z densytometrią do oceny trwałości kwasu nikotynowego i jego pochodnych.

Material i metody

Analiza termogravimetryczna

Analizę termogravimetryczną przeprowadzono stosując termogravimetr firmy Perkin Elmer. Do analizy termogravimetrycznej użyto: 1,370 mg kwasu nikotynowego (Sigma-Aldrich, Niemcy), 1,169 mg nikotynamidu (Sigma-Aldrich, Niemcy), 2,568 mg nikotynianu metylu (Sigma-Aldrich, Niemcy) oraz 8,078 mg nikotynianu heksylu (Aldrich, Niemcy). Termogravimetr utrzymywano przez 1 min w temp. 25°C. Następnie analizę przeprowadzano w zakresie od 25°C do 700°C, przy wzroście temperatury 20°C na min.

Badanie chemicznej trwałości kwasu nikotynowego i jego pochodnych w etanolowych roztworach przechowywanych w temperaturze 8°C

Roztwory kwasu nikotynowego, nikotynamidu oraz roztwory estrów kwasu nikotynowego, mianowicie nikotynian metylu i heksylu o stężeniu 4 mg/mL etanolu przechowywano w temperaturze 8°C przez 2 lata. Po tym czasie sporządzono nowe wzorcowe roztwory etanolowe ww. substancji o takim samym stężeniu. Do badań chemicznej trwałości kwasu nikotynowego i jego pochodnych w etanolowych roztworach zastosowano płytki szklane pokryte żelazem krzemionkowym 60F₂₅₄ (#1.05715, E. Merck, Niemcy). Przed użyciem płytki aktywowano w suszarce laboratoryjnej (ED

53, Binder, Niemcy) przez 30 minut w temperaturze 120°C. Na aktywowane płytki chromatograficzne nanoszono w ilości 5 µl (co odpowiada 20 µg) roztwory przechowywane przez 2 lata w temperaturze 8°C (roztwory stare) oraz nowe wzorcowe roztwory badanych substancji. W przypadku chromatografowania kwasu nikotynowego na żelu krzemionkowym zastosowano fazę ruchomą metanol + benzen w stosunku objętościowym 50:50. W przypadku chromatografowania nikotynamidu na żelu krzemionkowym zastosowano fazę ruchomą aceton + n-heksan w stosunku objętościowym 50:50. Natomiast w przypadku chromatografowania estrów kwasu nikotynowego, tj.: nikotynianu metylu i nikotynianu heksylu na żelu krzemionkowym zastosowano fazę ruchomą aceton + n-heksan w stosunku objętościowym 30:70. Komorę firmy Camag (# 022.5255, Szwajcaria) wypełniono 50 cm³ odpowiedniej, wyżej wymienionej fazy ruchomej, i wysycano ją parami rozpuszczalnika przez 30 minut. Chromatogramy rozwijano na wysokość 14 cm w temperaturze pokojowej (18 ± 1°C).

Analiza densytometryczna i spektrodensytometryczna

Badania densytometryczne i spektrodensytometryczne przeprowadzono na densytmetrze (TLC Scanner 3) z oprogramowaniem winCATS firmy Camag. Analizę densytometryczną badanych substancji przeprowadzono w następujących warunkach: lampa deuterowa; wymiary szczeliny: 10,00 × 0,40 mm, Macro (dla kwasu nikotynowego); 8,00 × 0,20 mm, Macro (dla nikotynianu metylu); 12,00 × 0,60 mm, Macro (dla nikotynianu heksylu, nikotynamidu); szybkość skanowania: 20 mm/s; rozdzielczość: 100 µm/krok. Skanowanie wykonywano przy następujących długościach fali: $\lambda_{\max}$ = 263 nm dla kwasu nikotynowego, $\lambda_{\max}$ = 220 nm dla nikotynamidu, $\lambda_{\max}$ = 221 nm dla nikotynianu metylu i nikotynianu heksylu. Otrzymane na densytogramie pasma chromatograficzne poddano analizie spektrodensytometrycznej w następujących warunkach: lampa deuterowa; wymiary szczeliny: 10,00 × 0,40 mm, Macro (dla kwasu nikotynowego); 8,00 × 0,20 mm, Macro (dla nikotynianu metylu); 12,00 × 0,60 mm, Macro (dla nikotynianu heksylu, nikotynamidu); szybkość skanowania: 20 nm/s; rozdzielczość: 1 nm/krok; początkowa długość fali: 200 nm; końcowa długość fali: 350 nm.

Wyniki

Na rycinach 1–3 przedstawiono przykładowo termogravimetryczny rozkład kwasu nikotynowego, nikotynamidu oraz nikotynianu metylu.

Rycina 1. Termogravimetryczny rozkład kwasu nikotynowego.
Figure 1. Thermogravimetric decomposition of nicotinic acid.

Rycina 2. Termograwimetryczny rozkład nikotynamidu.
Figure 2. Thermogravimetric decomposition of nicotinamide.

Rycina 3. Termograwimetryczny rozkład nikotynianu metylu.
Figure 3. Thermogravimetric decomposition of methyl nicotinate.

W **tabeli 1** zaprezentowano wartości R_F , powierzchnie pasm chromatograficznych (%) oraz $\lambda_{\max}$ badanych substancji oraz ich produktów przemian chemicznych, powstałych

w trakcie przechowywania ich etanolowych roztworów.

Na **rycynie 4** przedstawiono densytogram nikotynianu heksylu, pochodzącego z etanolowego

Tabela 1. Wartości R_F , powierzchnie pasm chromatograficznych (%) oraz $\lambda_{\max}$ badanych substancji oraz ich produktów przemian chemicznych, powstałych w trakcie przechowywania ich etanolowych roztworów.

Table 1. R_F values, areas of the chromatographic bands (%) and $\lambda_{\max}$ of investigated substances and their chemical changes products formed during the storage of their ethanolic solutions.

Badana substancja	Roztwory pochodnych kwasu nikotynowego					
	Przechowywane w temperaturze 8°C przez 2 lata			Roztwór wzorcowy		
	wartość R_F	powierzchnia pasm chromatograficznych (%)	$\lambda_{\max}$ [nm]	wartość R_F	powierzchnia pasm chromatograficznych (%)	$\lambda_{\max}$ [nm]
Kwas nikotynowy ^{a)}	0,00 0,41	2,23 97,77	266 264	0,00 0,39	1,37 98,63	221 264
Nikotynamid ^{b)}	0,16	100	264	0,15	100	219
Nikotynian metylu ^{c)}	0,35 0,40	91,25 8,75	221 265	0,34 –	100 –	220 –
Nikotynian heksylu ^{c)}	0,42 0,48	21,69 78,31	265 221	– 0,48	– 100	– 221

Zastosowane fazy ruchome:

^{a)} metanol + benzen, 50:50 (v/v)

^{b)} aceton + *n*-heksan, 50:50 (v/v)

^{c)} aceton + *n*-heksan, 30:70 (v/v)

Rycina 4. Densytogram nikotynianu heksylu pochodzącego z etanolowego roztworu: (a) sporządzonego bezpośrednio przed eksperymentem; (b) przechowywanego przez 2 lata w temperaturze 8°C; gdzie: NH – nikotynian heksylu; P – substancja będąca produktem przemian chemicznych nikotynianu heksylu.

Figure 4. The densitogram of hexyl nicotinate from an ethanolic solution: (a) prepared before the experiment; (b) stored at 8°C for 2 years; where: NH- hexyl nicotinate; P- a product of the chemical change of hexyl nicotinate.

roztworu, który był sporządzony bezpośrednio przed eksperymentem (4a) oraz przechowywanego przez 2 lata w temperaturze 8°C (4b).

Na **rycinie 5** przedstawiono spektrodensytogramy nikotynianu heksylu, pochodzącego ze starego i nowo sporządzonego etanolowego roztworu. Natomiast na **rycinie 6** przedstawiono

Rycina 5. Spektrodensytogramy nikotynianu heksylu w etanolowym roztworze o wartości $R_F = 0,48$ przechowywanego przez 2 lata w temperaturze 8°C oraz nikotynianu heksylu pochodzącego z nowo sporządzonego etanolowego roztworu.

Figure 5. The spectrodensitograms of hexyl nicotinate ($R_F = 0,48$) in ethanolic solution stored at 8°C for 2 years and hexyl nicotinate coming from a new prepared ethanolic solution.

Rycina 6. Spektrodensytogram produktu (o wartości $R_F = 0,42$) powstałego w czasie 2-letniego przechowywania nikotynianu heksylu w roztworze etanolowym w temperaturze 8°C.

Figure 6. The spectrodensitogram of the product ($R_F = 0,42$) formed during 2 years of storage of hexyl nicotinate in an ethanolic solution at 8°C.

spektrodensytogram substancji będącej produktem przemian chemicznych nikotynianu heksylu.

Omówienie wyników

Na podstawie analizy termogravimetrycznej (**rycina 1**) stwierdzono 1% ubytek masy kwasu nikotynowego w temperaturze 155,5°C, 2% ubytek masy kwasu nikotynowego w temperaturze 165°C oraz 50% ubytek masy kwasu nikotynowego w temperaturze 217°C. Natomiast nie stwierdzono całkowitego zaniku kwasu nikotynowego (pozostał na poziomie 5%). W przypadku nikotynamidu (**rycina 2**) stwierdzono 1% ubytek masy nikotynamidu w temperaturze 146°C, 2% ubytek masy nikotynamidu w temperaturze 153°C oraz 50% ubytek masy nikotynamidu w temperaturze 203,4°C. Natomiast nie zaobserwowano całkowitego zaniku nikotynamidu (pozostaje na poziomie 4%). Analiza termogravimetryczna nikotynianu metylu (**rycina 3**) pokazała 1% ubytek masy nikotynianu metylu w temperaturze 55,8°C, 2% ubytek masy nikotynianu metylu w temperaturze 62°C oraz 50% ubytek masy nikotynianu metylu w temperaturze 115°C. Całkowity zanik nikotynianu metylu nastąpił w temperaturze 149,5°C. Dla nikotynianu heksylu również zaobserwowano całkowity jego zanik, który nastąpił w temperaturze 392,2°C. Ponadto, stwierdzono 1% ubytek masy nikotynianu heksylu w temperaturze 109,3°C, 2% ubytek masy nikotynianu heksylu w temperaturze 121,6°C oraz 50% ubytek masy nikotynianu heksylu w temperaturze 203,4°C.

W dalszej części pracy badano chemiczną trwałość kwasu nikotynowego i jego pochodnych przechowywanych w roztworach etanolowych w temperaturze 8°C przez 2 lata. Wykonane analizy densytometryczne i spektrodensytometryczne, po naniesieniu roztworów badanych substancji na żel krzemionkowy i ich rozwinięciu w odpowiedniej fazie ruchomej wykazały, że nikotynian metylu i nikotynian heksylu ulegają przemianom chemicznym w trakcie 2-letniego przechowywania ich etanolowych roztworów w temperaturze 8°C (**tabela 1**). Oprócz nikotynianu metylu o wartości $R_F = 0,35$ stwierdzono obecność substancji będącej produktem przemian chemicznych nikotynianu metylu o wartości $R_F = 0,40$. Natomiast oprócz nikotynianu heksylu o wartości $R_F = 0,48$ stwierdzono obecność substancji będącej produktem przemian chemicznych nikotynianu heksylu o wartości $R_F = 0,42$. Analiza spektrodensytometryczna nikotynianu heksylu i metylu wykazała, że ich pasma podstawowe występują przy $\lambda_{\max} = 221$ nm. Natomiast pasma podstawowe produktów rozkładu nikotynianu heksylu i metylu występują przy $\lambda_{\max} = 265$ nm. Potwierdzeniem tego są przedstawione na **rycinie 5** spektrodensytogramy

nikotynianu heksylu, pochodzące roztworu przechowywanego przez 2 lata w temperaturze 8°C i nowo sporządzonego etanolowego roztworu, które są identyczne ($\lambda_{\max} = 221 \text{ nm}$). Natomiast spektrodensytogram substancji, będącej produktem przemian chemicznych nikotynianu heksylu, przedstawiony na **rycynie 6** posiada $\lambda_{\max} = 265 \text{ nm}$.

Z kolei, kwas nikotynowy w trakcie przechowywania jego etanolowego roztworu ulega nieznacznym przemianom chemicznym. Ilość produktów rozkładu nieznacznie wzrasta w stosunku do roztworu wzorcowego. Jedynie nikotynamid nie ulegał żadnym przemianom chemicznym w trakcie 2-letniego przechowywania jego etanolowego roztworu w temperaturze 8°C.

Wnioski

Analiza termogravimetryczna wskazała, że kwas nikotynowy i nikotynamid są trwalszymi związkami w stosunku do nikotynianu metylu i nikotynianu heksylu. Potwierdzeniem tego spostrzeżenia są wyniki analiz trwałości ww. związków w etanolowych roztworach, a uzyskane techniką TLC w połączeniu z densytometrią.

Na podstawie przeprowadzonej analizy termogravimetrycznej stwierdzono całkowity zanik nikotynianu metylu w temperaturze 149,5°C oraz nikotynianu heksylu w temperaturze 392,2°C. Ponadto, nikotynian metylu i nikotynian heksylu ulegają przemianom chemicznym w trakcie 2-letniego przechowywania ich etanolowych roztworów w temperaturze 8°C.

Podziękowania

Badania zostały sfinansowane przez Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach w ramach badań statutowych.

Konflikt interesów

Autorzy, Wioletta Parys oraz Alina Pyka-Pająk, jednomyślnie oświadczają, że nie mają żadnego konfliktu interesów.

Piśmiennictwo

- Gentilcore D. Louis Sambon and the clash of pellagra etiologies in Italy and the United States, 1905–1914. *J Hist Med Allied Sci.* 2016; 71(1): 19–42. doi: 10.1093/jhmas/jrv002. Epub 2015 Mar 4.
- Kirkland JB, Zemleni J, Suttie JW, Gregory III JF, Stover PJ. *Handbook of Vitamins.* 5th ed, CRC Press; 2013.
- Badawy AA. Pellagra and alcoholism: A biochemical perspective. *Alcohol Alcohol.* 2014; 49(3): 238–250. doi: 10.1093/alc/alz010.
- Jagielska G, Tomaszewicz-Libudzić EC, Brzozowska A. Pellagra: A rare complication of anorexia nervosa. *Eur Child Adolesc Psychiatry.* 2007; 16(7): 417–420.
- Monteiro JP, da Cunha DF, Filho DC, Silva-Vergara ML, dos Santos VM, da Costa JC, et al. Niacin metabolite excretion in alcoholic pellagra and AIDS patients with and without diarrhea. *Nutrition.* 2004; 20(9): 778–782.
- Park SM, Li T, Wu S, Li WQ, Weinstock M, Qureshi AA, et al. Niacin intake and risk of skin cancer in US women and men. *Int J Cancer.* 2017; 140(9): 2023–2031. doi: 10.1002/ijc.30630.
- Kirkland JB. Niacin status and treatment-related leukemogenesis. *Mol Cancer Ther.* 2009; 8(4): 725–732. doi: 10.1158/1535-7163.MCT-09-0042.
- Rosmaninho A, Sanches M, Fernandes IC, Pinto-Almeida T, Vilaça S, Oliveira A, et al. Letter: Pellagra as the initial presentation of Crohn disease. *Dermatol Online J.* 2012; 18(4): 12.
- Larsen SW, Thomsen AE, Rinvar E, Friis GJ, Larsen C. Effect of drug lipophilicity on in vitro release rate from oil vehicles using nicotinic acid esters as model prodrug derivatives. *Int J Pharm.* 2001; 216(1–2): 83–93.
- Müller B, Kasper M, Surber C, Imanidis G. Permeation, metabolism and site of action concentration of nicotinic acid derivatives in human skin. Correlation with topical pharmacological effect. *Eur J Pharm Sci.* 2003; 20(2): 181–195.
- Jumbelic LC, Liebel FT, Southall MD. Establishing a minimal erythema concentration of methyl nicotinate for optimum evaluation of anti-inflammatories. *Skin Pharmacol Appl Skin Physiol.* 2006; 19(3):147–152. doi:10.1159/000092595
- Zhai H, Zheng Y, Fautz R, Fuchs A, Maibach HI. Reactions of non-immunologic contact urticaria on scalp, face, and back. *Skin Res Technol.* 2012; 18(4): 436–441. doi: 10.1111/j.1600-0846.2011.00590.x.
- Mirdell R, Tesselaar E, Farnebo S. The microvascular response in the skin to topical application of methyl nicotinate: Effect of concentration and variation between skin sites. *Microvasc Res.* 2019; 124: 54–60. doi:10.1016/j.mvr.2019.03.002.
- Gabbott P. *Principles and Applications of Thermal Analysis.* Blackwell Publishing; 2008.
- Haines PJ. *Principles of Thermal Analysis and Calorimetry.* Royal Society of Chemistry; 2002.
- Wesołowski M. Współczesne metody analizy termicznej. Podstawowe pojęcia i definicje. *Laboratorium* 2007; 3: 40–44.
- Glass BD, Novák Cs, Brown ME. The thermal and photostability of solid pharmaceuticals. *J Therm Anal Calorim.* 2004; 77: 1013–1036.
- Wesołowski M, Konarski T. Metody analizy termicznej w badaniu reakcji substancji leczniczych w fazie stałej. *Farm Pol.* 1998; 59: 121–135.
- Waterman KC, Adami RC. Accelerated aging: Prediction of chemical stability of pharmaceuticals. *Int J Pharm.* 2005; 293(1–2): 101–125. doi:10.1016/j.ijpharm.2004.12.013

Otrzymano: 2019.09.09 · Zaakceptowano: 2019.09.16