Oznaczanie czystości mesylanu imatynibu metodą różnicowej kalorymetrii skaningowej

Paulina Topolska, Katarzyna Wigłusz, Igor Mucha

Uniwersytet Medyczny im. Piastów Śląskich we Wrocławiu, Wydział Farmaceutyczny z Oddziałem Analityki Medycznej, Katedra i Zakład Chemii Analitycznej, ul. Borowska 211 A, 50-566 Wrocław

Adres do korespondencji: Igor Mucha, Uniwersytet Medyczny im. Piastów Śląskich we Wrocławiu, Wydział Farmaceutyczny z Oddziałem Analityki Medycznej, Katedra i Zakład Chemii Analitycznej, ul. Borowska 211 A, 50-566 Wrocław, e-mail: igor.mucha@umed.wroc.pl

Wstęp i cel

Wprowadzenie nowego produktu leczniczego wymaga zachowania zasad Dobrej Praktyki Wytwarzania (*Good Manufacturing Practice*, GMP), dotyczącej zarówno procesu produkcji, jak i kontroli jakości preparatów farmaceutycznych, gwarantując tym samym bezpieczeństwo i skuteczność. Szczególnie ważny w tym ujęciu jest problem czystości substancji oraz obecnych w nich zanieczyszczeń. Farmakopea Amerykańska definiuje zanieczyszczenia jako każdy związek, który nie jest chemicznie identyczny z substancją aktywną. Zanieczyszczenia mogą powstawać podczas produkcji i przechowywania produktu leczniczego, wpływając na skuteczność, bezpieczeństwo i aktywność substancji leczniczej. Międzynarodowa Rada Harmonizacji Wymagań Technicznych dla Rejestracji Produktów Leczniczych Stosowanych u Ludzi (*International Council on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use*, ICH) zajmująca się ujednoliceniem wytycznych dotyczących opracowywania i regulacji produktów leczniczych, zaleca, aby badania czystości wykonywać kilkoma metodami [1].

Jeśli chodzi o aspekt czystości, Farmakopea zawiera wymagania dotyczące czystości chemicznej i mikrobiologicznej leku. Monografia substancji leczniczej określa szczegółowo standardy wykonywania każdego badania, w tym oznaczania czystości [2]. Dodatkowo Światowa Organizacja Zdrowia (*World Health Organization*, WHO) wydała raport dotyczący badań czystości leku, według którego metody analityczne temu służące zostały podzielone na trzy kategorie [3]. Do pierwszej z nich należą metody wymagające porównania z substancją

Determination of the imatinib mesylate purity by differential scanning calorimetry

Determination of purity is one of the methods of controlling active ingredient in pharmaceutical industry. It often requires using expensive reference materials and is a time-consuming one. A good way for determining purity of the substance, may be the use of differential scanning calorimetry (DSC), the one of the thermal analysis methods, most commonly used in pharmacy. In these studies, the purity of six samples of imatinib mesylate, provided by various laboratories, was determined. The measurements were made by using the DSC method in accordance with ASTM E928-08 norm. The results of the study were compared with purity presented in the certificates of the substance. Additionally, an influence of both the heating rate and mass changes of samples on determined value of imatinib mesylate purity, was investigated.

Keywords: Imatinib, DSC, purity.

© Farm Pol, 2018, 74(6): 325–333

referencyjną, takie jak elektroforeza kapilarna i metody chromatograficzne: wysokosprawna chromatografia cieczowa (*High-Performance Liquid Chromatography*, HPLC), cienkowarstwowa chromatografia cieczowa (*Thin Layer Chromatography*, TLC), chromatografia gazowa (*Gas Chromatography*, GC), chromatografia cieczowa sprzężona ze spektrometrią mas (*Liquid Chromatography-Mass Spectrometry*, LC-MS). Kolejną kategorią obejmuje metody oparte na właściwościach termodynamicznych – różnicowa kalorymetria skaningowa (*Differential Scanning Calorimetry*, DSC) i rzadziej stosowana analiza rozpuszczalności fazowej. Trzecią grupę stanowią metody spektroskopowe, miareczkowe oraz techniki umożliwiające wyznaczenie pomiaru skręcalności optycznej,

zawartości wilgoci i pozostałości lotnych związków organicznych. Farmakopea Japońska dzieli metody wyznaczania czystości leków na metody chemiczne oraz fizyczne. Do metod chemicznych zalicza oznaczanie zawartości metali ciężkich, substancji łatwo zwęglających się, zaś do fizycznych GC, TLC, MS, spektroskopię w zakresie ultrafioletu, wyznaczanie temperatury topnienia, straty masy przy prażeniu, przewodnictwo elektryczne, nefelometrię [4]. Farmakopee Polska, Europejska, Japońska i Amerykańska pozwalają na zastosowanie każdej z powyższych metod, w tym DSC, do oznaczania czystości leków.

W odróżnieniu od większości metod zastosowanie DSC umożliwia wykonanie powtarzalnych pomiarów w relatywnie krótkim czasie, przy niewielkiej masie próbki, bez użycia materiałów referencyjnych, co znacząco zmniejsza koszty przeprowadzanych badań [5]. W ramach tej pracy wykonano oznaczanie czystości sześciu próbek metylu imatynibu metodą DSC i porównano uzyskane rezultaty z wynikami deklarowanymi przez producenta. Ponadto zbadano i porównano wpływ zmiany masy naważek oraz szybkości ogrzewania na wyznaczoną czystość.

Zastosowanie DSC do wyznaczania czystości substancji czynnych

W przemyśle farmaceutycznym substancje referencyjne wykorzystywane są do wyznaczania siły działania i jakości leku, substancji czynnej (*Active Pharmaceutical Ingredients*, API), konserwantów, antyoksydantów i substancji pomocniczych. W wielu pracach oznaczano i porównywano

czystości substancji referencyjnych wyznaczone różnymi metodami. Jednym z przykładów są badania dotyczące oznaczania czystości teofiliny, będącej certyfikowanym materiałem referencyjnym, metodą bilansu masy, HPLC i DSC [6]. Wynika z nich, że dokładność metody masowej jest największa (99,82%). Czystość wyznaczona pozostałymi metodami była zbliżona (HPLC – 99,75%; DSC – 99,79%). Autorzy tej pracy uważają, że metoda masowa, jako charakteryzująca się dużą dokładnością, odpowiednia jest dla certyfikowanych materiałów referencyjnych i farmaceutycznych wzorców, nie wykluczając użycia do tego celu innych metod.

W innej pracy przebadano 16 substancji referencyjnych metodą DSC, sprawdzając czy metoda ta może być stosowana do badania czystości jako alternatywa dla HPLC [7]. Wyniki tych badań zostały zebrane i przedstawione w tabeli 1. Dla 15 substancji, różnica w czystości otrzymana metodą DSC, w porównaniu do metod referencyjnych, była mniejsza niż 2,0%, a dla 11 mniejsza niż 1,0%. Świadczy to o możliwości wykorzystania techniki DSC jako alternatywę dla innych metod do oznaczania czystości substancji referencyjnych. Autorzy zalecają, aby metodą DSC weryfikować czystość substancji badanych według metodologii rekomendowanych przez Farmakopee.

Badania terasosyny, w których wykorzystano tylko metody termooanalityczne, tj. termogravimetrię (*Thermogravimetry*, TG), termogravimetrię różniczkową (*Differential Thermogravimetry*, DTG), termiczną analizę różnicową (*Differential Thermal Analysis*, DTA) oraz DSC, wykazały, że

Tabela 1. Porównanie czystości substancji referencyjnych uzyskanych metodą DSC z wynikami otrzymanymi innymi metodami analitycznymi [7]

Nazwa substancji	Czystość (%)	Czystość DSC (%)	Różnica w czystości (%)
Dipropionian betametazonu	99,2	99,2	0,0
Propylparaben	100,0	100,0	0,0
Bisakodyl	99,3	99,2	0,1
Kwas salicylowy	99,1	99,0	0,1
Kofeina	99,6	99,7	0,1
Etynyloestradiol	100,0	99,9	0,1
Tolnaftat	100,0	99,8	0,1
Loratadyna	100,0	99,7	0,2
Acetaminofenon	99,7	100,0	0,3
Labetalol Hcl	100,0	99,2	0,8
Perfenazyna	98,8	98,9	0,9
Metylparaben	99,7	100,0	1,3
Maleinian azatadyny	99,5	98,0	1,5
Aspiryna	100,0	98,3	1,7
N – metylodesloratadyna	98,0	99,8	1,8
Perfenazyna	94,8	98,9	4,4

analiza termiczna może być bardzo użyteczna dodatkowo do oznaczania takich parametrów jak zawartość wody krystalizacyjnej i popiołu. Przy czym wyniki czystości terazosyny otrzymane metodą DSC (99,97%) były porównywalne z wynikami otrzymanymi z HPLC (99,85%) [8].

W innej pracy, za pomocą DSC wyznaczono czystość zydowudyny, jej temperaturę topnienia oraz ciepło topnienia [9]. Łącznie przebadano próbki zydowudyny z sześciu niezależnych laboratoriów i porównywano z substancją referencyjną zgodną z USP (*United States Pharmacopeia*). Czystość przebadanych związków wahała się w granicach od 97,59–99,54%, a dla próbki referencyjnej wyniosła 99,83%. Autorzy pracy wykazali również nieznaczne różnice między ekstrapolowaną temperaturą topnienia (T_{onset}) próbek (118,70–122,87°C) w porównaniu z zydowudyną spełniającą normy Farmakopei Amerykańskiej (122,80°C).

W ostatnich latach obserwuje się znaczący wzrost zainteresowania analizą termiczną, w tym DSC. Przedstawione przykłady badań jednoznacznie wskazują na użyteczność metody DSC do wyznaczania czystości leków. Wyniki oznaczeń czystości otrzymane z DSC są porównywalne z rezultatami innych metod rekomendowanych przez Farmakopee.

Inne zastosowania DSC w farmacji i medycynie

Różnicowa kalorymetria skaningowa jest metodą termoanalityczną, która znalazła szerokie zastosowanie w farmacji i medycynie, umożliwiając analizę zachowań termicznych badanej substancji. Poza wyznaczaniem czystości stosowana jest m.in. do badania zjawiska polimorfizmu, stabilności leków, interakcji leków z substancjami pomocniczymi, przejść fazowych, rozkładu, a także przepuszczalności błon biologicznych dla leków [10–15].

Oprócz wyżej wymienionych zastosowań tej techniki ciekawe jest jej wykorzystanie w analizie stabilności błon liposomów. Zastosowanie DSC do badania zmian termodynamicznych dwuwarstwy lipidowej po inkorporowaniu w niej leku umożliwia badanie interakcji leku z nośnikiem lipidowym i biodostępności. Parametry termodynamiczne uzyskane przy użyciu DSC odpowiadają nie tylko za farmakokinetykę leku, ale również stabilność zawiesin liposomalnych w określonych warunkach przechowywania [16].

Na szczególną uwagę zasługuje fakt, że prowadzone są badania nad możliwością wykorzystania DSC w diagnozowaniu takich chorób jak układowy toczeń rumieniowaty, reumatoidalne zapalenie stawów, borelioza, rak piersi, rak jajnika [17]. Badanie osocza krwi pacjentek chorujących na raka szyjki macicy wykazało znaczące zmiany w krzywych DSC w porównaniu z wynikami grupy kontrolnej. Dla

grupy badanej zauważono między innymi wzrost temperatury denaturacji białek. Autorzy pracy sugerują, że zmiany te związane są z interakcjami małych molekuł lub peptydów z białkami osocza, pozwalając uzyskać informację nawet na temat stadium choroby [18, 19].

Materiały i metody

Materiały

Mesylan imatynibu ($C_{30}H_{35}N_7SO_4$; 4-[(4-metylopiperazyn-1-yl) metylo] -N-[4-metylo-3-[(4-(pirydyn-3-yl) pirymidyn-2-yl) amino] fenylo] benzamidyno metanosulfonian) wprowadzony został na rynek amerykański w 2001 r. pod nazwą handlową Gleevec, jako pierwszy lek będący inhibitorem kinazy tyrozynowej. Obecnie na rynku polskim dostępne są preparaty pod nazwami: Glivec, Imatinib Accord, Imatinib Teva, Meaxin, Nibix oraz Telux. Stosowany jest u pacjentów z przewlekłą białaczką szpikową, u których w wyniku translokacji chromosomalnej (chromosom 9 i 22) obserwuje się zwiększenie aktywności kinazy tyrozynowej Bcr-Abl. Wzrost ekspresji tej kinazy powoduje niekontrolowane namnażanie się białych krwinek. Lek ten wiąże się z miejscem wiązania dla ATP, powodując zahamowanie transdukcji sygnału, prowadząc do indukcji apoptozy komórek nowotworowych. Imatinib jest również inhibitorem innych kinaz tyrozynowych: cKit (receptor dla SCF) i receptorów α i β płytko pochodnego czynnika wzrostu (PDGFR- α , PDGFR- β), receptorów domeny dyskiidynowej (DDR1 i DDR2), receptorów czynnika stymulującego kolonie (CSF-1R) [20].

Mesylan imatynibu jest związkiem wykazującym zjawisko polimorfizmu. Spośród wielu form krystalicznych imatynibu w przemyśle farmaceutycznym stosuje się tylko formę α i β . Różnią się one między sobą temperaturą topnienia, rozpuszczalnością, stabilnością oraz biodostępnością, wpływając tym samym na właściwości postaci leku. W badaniach przeprowadzonych w 2015 r. porównywano wyniki ilościowego oznaczania obu form polimorficznych imatynibu w API i w tabletkach o różnej zawartości formy β . W tym celu zastosowano proszkową dyfraktometrię rentgenowską (*Powder X-Ray Diffraction*, PXRD), DSC oraz spektroskopię w podczerwieni z transformacją Fouriera (*Attenuated Total Reflection-Fourier Transform Infrared*, ATR-FTIR). Wykorzystanie DSC i PXRD pozwoliło na wykrycie 1% formy β w API i 4% w tabletkach. Czulość ATR-FTIR była zdecydowanie niższa i pozwoliła na detekcję dopiero 12% formy β zarówno w tabletkach, jak i w API. Dodatkowo zauważono, że w mieszaninie form α i β w temperaturze topnienia forma β ulega konwersji do formy α [21]. Forma β wykazuje większą stabilność w temperaturze poniżej 140°C,

podczas gdy forma α charakteryzuje się metastabilnością [22]. Ponadto forma β cechuje się mniejszą higroskopijnością w porównaniu do formy α , dzięki czemu jest stabilniejsza podczas przechowywania. Z kolei dzięki lepszym właściwościom mechanicznym proszków, w tym zdolności do płynięcia, forma β łatwiej może być przetwarzana [23]. Należy również zwrócić uwagę na dobór odpowiednich procesów technologicznych podczas przetwarzania próbek. Wraz z wydłużeniem czasu mielenia obserwuje się wzrost ilości formy amorficznej imatynibu. Podczas tygodniowego przechowywania leku zaobserwowano zmniejszenie ilości postaci amorficznej, która uległa konwersji do formy β w temperaturze pokojowej [22].

W badaniach wykonanych w ramach tej pracy wykorzystano sześć próbek mesylanu imatynibu pochodzących od pięciu producentów (CAS: 220127-57-1), które zostały oznaczone literami od A do F:

- A – Sigma Aldrich (SML 1027, czystość 99,6%, NMR),
- B – Sigma Aldrich (CDS022105, brak certyfikatu czystości),
- C – Silesian Catalysts (zsyntetyzowany w ramach projektu PROAPI, współfinansowanego przez Unię Europejską z Europejskiego Funduszu Regionalnego, czystość 98,07%, NMR),
- D – LC Laboratories (I-5508, czystość 94,66%, NMR),
- E – J&K Scientific (194937, czystość $\geq 98\%$, HPLC),
- F – abcr GmbH (AB 285059, czystość $\geq 97\%$, NMR).

DSC

Badania wykonano na różnicowym kalorymetrze skaningowym DSC 214 Polyma firmy Netzsch, którego schemat wraz z przekrojem przedstawiono na **rycynie 1**.

Użycie owalnego pieca o niewielkiej masie termicznej oraz zewnętrznej jednostki chłodzącej (In-tracooler „IC70”) pozwala na chłodzenie i ogrzewanie próbek w zakresie temperatur od -70 do 600°C z szybkością od $0,001$ do 500 K/min . Czujnik DSC Corona zbudowany z rdzenia niklowo-chromowego i pierścienia z konstantanu umożliwia polepszenie powtarzalności wyników. Dzięki zastosowaniu funkcji BeFlat możliwe jest uzyskanie linii bazowej z minimalnymi odchyleniami w zakresie μW . Podczas badań można zastosować odpowiednie gazy oraz sterować ich przepływem, aby zapewnić właściwą atmosferę wykonywanych pomiarów. Wykorzystanie automatycznego urządzenia próbującego (autosampler) (**rycina 1**) z miejscem na 20 próbek znacząco przyspiesza i usprawnia pracę. Do przeprowadzenia pomiarów i analizy otrzymanych wyników zastosowano oprogramowanie Proteus® firmy Netzsch.

Kalibrację aparatu przeprowadzono w oparciu o zestaw kalibracyjny 6.239.2-91.3 (Netzsch) zawierający: ind (99,999%; $156,6^{\circ}\text{C}$), cynę (99,99%; $231,9^{\circ}\text{C}$), bizmut (99,999%; $271,4^{\circ}\text{C}$), cynk (99,999%; $419,5^{\circ}\text{C}$), chlorek cezu (99,999%; 646°C) oraz rtęć (99,99%; $-38,8^{\circ}\text{C}$). Dostępna w pakiecie funkcja autokalibracji oferuje zbiór predefiniowanych metod kalibracyjnych dla wybranych wzorców, zapewniając całkowicie automatyczny proces analizy krzywych DSC, obliczenie krzywych kalibracyjnych oraz sprawdzenie ich poprawności.

Substancje krystaliczne zostały odważone w standardowych tygłach aluminiowych o objętości $25,0\text{ }\mu\text{l}$ na wadze analitycznej Sartorius CPA225D-0CE z dokładnością do $0,00001\text{ g}$, a następnie zamknięte pokrywą z otworem. Próbkę ogrzewano w atmosferze azotu przy przepływie 25 mL/min ze stałą szybkością ogrzewania. Po stopieniu próbki chłodzono do temperatury pokojowej z szybkością

Rycina 1. Schemat budowy oraz przekrój skaningowego kalorymetru różnicowego Netzsch DSC 214 Polyma [24]. Przedruk z zgodą NETZSCH-Gerätebau GmbH

10,0 °C/min i ważono ponownie. Jako odnośnik stosowano pusty tygiel aluminiowy z pokrywką. Dla każdej próbki zostały wykonane minimum 3 serie pomiarowe. **Rycina 2** przedstawia przykładową krzywą DSC dla mesylanu imatynibu (A) wraz z wyznaczonymi parametrami.

Czystość badanych próbek została wyznaczona wykorzystując opcję programu Proteus-Purity Determination zgodnie z normą ASTM E928-08 [25]. Według wytycznych w niej zamieszczonych badanie czystości powinno spełniać następujące kryteria:

- masa próbki 1–3 mg z dokładnością do 0,01 mg;
- przepływ azotu 15–50 mL/min;
- ogrzewanie próbki z szybkością 0,3–0,7 °C/min 25 °C poniżej temperatury topnienia;
- minimum 200 punktów pomiarowych w zakresie topnienia;
- ubytek masy próbki po pomiarze mniejszy niż 1 %;
- tygle powinny zostać wykonane z materiałów o dużej przewodności cieplnej i niereagujących z próbką;
- pomiar pola powierzchni endotermy wyznaczany w przedziale 10–50% całkowitej powierzchni pików;
- zanieczyszczenia muszą być rozpuszczalne w fazie ciekłej;
- mieszanina występuje w fazie ciekłej w postaci jednego lub więcej eutektyków.

Do oznaczenia czystości mesylanu imatynibu zostało zastosowane równanie van't Hoffa, które przedstawia zależność między obniżeniem temperatury topnienia substancji czystej pod wpływem zawartych w niej zanieczyszczeń a stężeniem tych zanieczyszczeń [26, 27]:

$$T_s = T_0 - \frac{RT_0^2 x}{\Delta H_f} \cdot \frac{1}{F}$$

gdzie:

T_s – temperatura próbki

T_0 – temperatura topnienia czystej substancji

R – stała gazowa (8,314 J/mol·K)

x – ułamek molowy zanieczyszczeń

H_f – ciepło topnienia czystej substancji (J/mol)

F – ułamki molowe substancji

Frakcję substancji (F) stopioną w temperaturze T_s opisuje zależność:

$$F = \frac{T_0 - T_m}{T_0 - T_s} \rightarrow T_s = T_0 - \frac{T_0 - T_m}{F}$$

gdzie:

T_m – temperatura topnienia zanieczyszczającego składnika.

Wartość $1/F$ wyznacza się, jako stosunek powierzchni całkowitej pików do powierzchni objętych poszczególnymi temperaturami T_s .

Rycina 2. Krzywa DSC mesylanu imatynibu (A) z wyznaczonymi parametrami

Rycina 3. Przykładowa krzywa DSC z zakresem wyznaczonym zgodnie z normą ASTM

Rycina 3 przedstawia przykładową krzywą DSC zarejestrowaną w zakresie wytyczonym zgodnie z normą ASTM E928-08 (linia czerwona).

Aby rozwiązać równanie van't Hoffa, należy wykreślić zależność T_s w funkcji $1/F$. Otrzymany wykres nie zawsze jest linią prostą, mimo iż obniżenie temperatury topnienia badanej substancji zależy liniowo od stężenia zanieczyszczeń. Wyznaczenie frakcji substancji stopionej w niższych temperaturach jest utrudnione w wyniku rozszerzenia temperatury topnienia próbki wraz ze wzrostem stężenia zanieczyszczeń. Przyczyną tego jest termiczna oporność przyrządu, tworzenie roztworów stałych, ograniczenie czułości różnicowego kalorymetru skaningowego utrudniające rejestrację początkowego etapu topnienia. Dlatego też wykonuje się linearyzację zależności T_s od $1/F$, uzyskując prostą o nachyleniu równym obniżeniu temperatury topnienia czystego składnika

$$- \frac{RT_0^2 x}{\Delta H_f} [26].$$

Rycina 4. Graficzna postać równania van't Hoffa wraz z linearyzacją dla mesylanu imatynibu (A)

Graficzną postać równania van't Hoffa wraz z linearyzacją dla mesylanu imatynibu prezentuje **rycina 4**. Na jej podstawie można odczytać stężenie zanieczyszczeń obecnych w badanej próbce. Przecięcie prostej z linią rzędnych odpowiada temperaturze topnienia czystej substancji.

Stosowanie równania van't Hoffa ma liczne ograniczenia [28]:

- utworzenie przez zanieczyszczenia prostego eutektyku z podstawowym składnikiem mieszaniny;
- zanieczyszczenia powinny być nierozpuszczalne w fazie stałej, ale całkowicie rozpuszczalne w fazie ciekłej;
- istnienie równowagi termodynamicznej między fazą ciekłą zawierającą zanieczyszczenia i fazą stałą.

Tylko idealnie rozcieńczone roztwory spełniają równanie van't Hoffa, dlatego stosowane jest zazwyczaj tylko dla próbek o czystości większej niż 98,0 mol%. Dodając do substancji zanieczyszczonej czysty związek, do uzyskania czystości 99,0 mol%, możliwe jest wyznaczenie stężenia zanieczyszczeń do 20,0 mol%.

Dodatkowo metoda ta nie powinna być stosowana do oznaczania czystości leków, które pod wpływem temperatury ulegają rozkładowi, gdyż

reakcje rozkładu i topnienia są reakcjami endotermicznymi, co utrudnia interpretację wyników. Nie może być również użyta w celu oznaczenia czystości związków reagujących między sobą lub z materiałem tygla. Związki posiadające odmiany polimorficzne powinny być przeprowadzone w jedną z form. Metoda ta jest niespecyficzna – wiele zanieczyszczeń może powodować rozszerzenie piku. Z tego powodu DSC nie nadaje się do identyfikacji zanieczyszczeń, ale do oznaczania procentowej czystości próbki. Zaletą stosowania DSC jest fakt, że nie wymaga ona dużej masy próbki (kilka miligramów), jest relatywnie szybka, a wyniki są powtarzalne. Ponadto zmiana szybkości ogrzewania znacząco wpływa na wyznaczony stopień czystości próbki [5, 9].

Wyniki badań

Rezultatem przeprowadzonych badań było wyznaczenie czystości sześciu różnych próbek mesylanu imatynibu metodą DSC. Otrzymane wyniki zostały zebrane i porównane z wartościami czystości deklarowanymi przez producentów substancji (**tabela 2**). W celu ujednolicenia pomiarów, próbki badano zgodnie z normą ASTM E928-08. Probki o masie $1,50 \pm 0,05$ mg były ogrzewane początkowo z szybkością $50,0^\circ\text{C}/\text{min}$ od temperatury $25,0^\circ\text{C}$ do $170,0^\circ\text{C}$, a następnie do $230,0^\circ\text{C}$ z szybkością $0,5^\circ\text{C}/\text{min}$. Pomiaru zostały wykonane w atmosferze azotu przy przepływie $25,0$ ml/min. Na podstawie zarejestrowanych krzywych DSC wyznaczono ekstrapolowane temperatury topnienia próbek (T_{onset}) i odpowiadające im efekty cieplne (**tabela 2**).

Dodatkowo przeprowadzono badania mające na celu sprawdzenie wpływu szybkości ogrzewania na wyznaczoną czystość mesylanu imatynibu (A), dlatego rejestrację krzywych DSC próbek o masie $1,50 \pm 0,05$ mg analizowano przy różnych szybkościach ogrzewania: $0,5$; $2,5$; $5,0$; $10,0$ i $20,0^\circ\text{C}/\text{min}$ w zakresie temperatury $170,0$ – $230,0^\circ\text{C}$. Przykładowe zestawienie krzywych DSC dla wybranej serii pomiarowej zostało przedstawione na **rycynie 5**. Uzyskane wyniki zaprezentowano w **tabeli 3**.

Tabela 2. Zestawienie wyników badań uzyskanych zgodnie z normą ASTM E928-08

Badana próbka	$T_{\text{onset}} [^\circ\text{C}]$	$\Delta H [\text{J/g}]$	Czystość DSC [%]	Czystość wyznaczona przez producentów [%]	Różnica w czystości [%]
A	$216,8 \pm 0,1$	$121,8 \pm 0,6$	$98,93 \pm 0,03$	99,60	0,67
B	$224,7 \pm 0,1$	$103,5 \pm 2,5$	$99,03 \pm 0,05$	Brak danych	–
C	$214,6 \pm 2,6$	$79,8 \pm 1,7$	$93,17 \pm 0,04$	98,07	4,90
D	$221,5 \pm 0,1$	$107,5 \pm 1,7$	$93,99 \pm 0,08$	94,66	0,67
E	$220,2 \pm 0,6$	$78,1 \pm 6,1$	$96,66 \pm 0,03$	98,00	1,34
F	$222,3 \pm 0,1$	$90,3 \pm 3,5$	$97,27 \pm 0,02$	97,00	0,27

Ponadto w pracy zostały wykonane pomiary przy stałej szybkości ogrzewania ($0,5^\circ\text{C}/\text{min}$ w zakresie temperatury $170,0\text{--}230,0^\circ\text{C}$) dla mesylanu imatynibu (A) o masach $0,5$; $1,5$; $3,0$; $5,0$ oraz $7,5$ mg. **Rycina 6** obrazuje krzywe DSC dla jednej serii pomiarowej. Wyniki analizy wpływu zmiany masy naważek na wyznaczoną czystość preparatu wraz z ekstrapolowaną temperaturą topnienia (T_{onset}), temperaturą maksimum pików (T_{max}) oraz wartościami efektów cieplnych zostały zebrane w **tabeli 4**.

Wnioski

Różnicowa kalorymetria skaningowa jest jedną z najczęściej stosowanych technik analizy termicznej w farmacji. Jedną z zalet DSC szczególnie zasługującą na podkreślenie jest możliwość wyznaczenia czystości leków, co jest niezwykle istotne dla bezpieczeństwa i skuteczności farmakoterapii. W niniejszej pracy oznaczano czystość sześciu różnych próbek mesylanu imatynibu metodą różnicowej kalorymetrii skaningowej, a uzyskane wyniki porównywano z czystością handlowych preparatów.

Dla trzech badanych związków (A; D; F) wyznaczona czystość różniła się o mniej niż 1% . W przypadku mesylanu imatynibu dostarczonego przez J&K Scientific (E) różnica między wyznaczoną czystością a wynikami otrzymanymi metodą HPLC wyniosła $1,34\%$. Spośród sześciu badanych substancji najwyższą czystością oznaczoną metodą DSC charakteryzuje się próbka B, której czystość nie została zbadana przez producenta. Wyznaczone na podstawie krzywych DSC ekstrapolowane temperatury topnienia (T_{onset}) dla substancji pochodzących z różnych laboratoriów wykazują wahania w zakresie $214,6\text{--}224,7^\circ\text{C}$. Dla mesylanu imatynibu (C) wykonano badania mające na celu sprawdzenie wpływu warunków przechowywania na zmiany zawartości substancji czystej. Próbka ta charakteryzowała się najniższą czystością i najwyższą różnicą w porównaniu do wyników otrzymanych metodą HPLC. Ma to związek z tym, że substancja ta uległa częściowemu rozkładowi podczas przechowywania w nieodpowiednich warunkach (temperatura pokojowa zamiast zalecanej przez producenta).

Tabela 4. Wpływ wielkości masy naważek mesylanu imatynibu (A) ogrzewanego z szybkością $0,5^\circ\text{C}/\text{min}$ na wyznaczone wartości czystości, temperatur topnienia i entalpii topnienia

Masa próbki [mg]	Czystość DSC [%]	$T_{\text{onset}} [^\circ\text{C}]$	$T_{\text{max}} [^\circ\text{C}]$	$\Delta H [\text{J/g}]$
0,5	$98,95 \pm 0,03$	$216,7 \pm 0,1$	$217,5 \pm 0,1$	$122,2 \pm 2,5$
1,5	$98,93 \pm 0,03$	$216,9 \pm 0,1$	$217,7 \pm 0,1$	$121,8 \pm 1,6$
3,0	$99,00 \pm 0,02$	$217,0 \pm 0,1$	$217,8 \pm 0,1$	$119,1 \pm 1,3$
5,0	$98,92 \pm 0,03$	$217,0 \pm 0,1$	$218,0 \pm 0,1$	$120,0 \pm 2,5$
7,5	$98,87 \pm 0,01$	$217,1 \pm 0,1$	$218,1 \pm 0,1$	$124,2 \pm 2,8$

Rycina 5. Krzywe DSC mesylanu imatynibu (A) o masie $1,50$ mg wyznaczone dla różnych szybkości ogrzewania

Tabela 3. Wpływ szybkości ogrzewania na wyznaczoną wartość czystości mesylanu imatynibu (A)

Szybkość ogrzewania [$^\circ\text{C}/\text{min}$]	Czystość DSC [%]	$T_{\text{onset}} [^\circ\text{C}]$	$T_{\text{max}} [^\circ\text{C}]$	$\Delta H [\text{J/g}]$
0,5	$98,93 \pm 0,03$	$216,8 \pm 0,1$	$217,7 \pm 0,1$	$125,0 \pm 0,6$
2,5	$97,78 \pm 0,03$	$216,7 \pm 0,1$	$218,3 \pm 0,1$	$120,2 \pm 3,0$
5,0	$97,06 \pm 0,06$	$216,6 \pm 0,1$	$218,7 \pm 0,1$	$118,8 \pm 0,1$
10,0	$96,33 \pm 0,09$	$216,7 \pm 0,1$	$219,6 \pm 0,1$	$115,9 \pm 0,5$
20,0	$94,13 \pm 0,06$	$217,0 \pm 0,1$	$220,9 \pm 0,2$	$118,1 \pm 3,0$

Rycina 6. Krzywe DSC mesylanu imatynibu (A) wyznaczone dla mas od $0,5$ mg do $7,5$ mg

Rycina 7. Wpływ szybkości ogrzewania na wyznaczoną wartość czystości mesylanu imatynibu (A)

Rycina 8. Wpływ masy próbek na wyznaczoną wartość czystości mesylanu imatynibu (A)

W pracy badano również wpływ szybkości ogrzewania i zmiany masy próbek na oznaczaną czystość. Zwiększenie szybkości ogrzewania z 0,5 °C/min do 20 °C/min powoduje, że obserwowana czystość próbek jest niższa i wynosi odpowiednio od 98,93% do 94,13% (rycina 7). Wyniki te jednoznacznie wykazują, że szybkość ogrzewania ma znaczący wpływ na oznaczaną czystość, powodując zmniejszenie czystości wraz ze wzrostem szybkości ogrzewania. Taka sama tendencja została przedstawiona w innych badaniach [5, 9]. Wyniki te tłumaczone są tym, że równanie van't Hoffa spełnione jest tylko w warunkach równowagi, dlatego zalecane jest wyznaczanie czystości przy mniejszej szybkości ogrzewania. Wyznaczone ekstrapolowane temperatury topnienia (T_{onset}) nie uległy znaczącym zmianom (216,6–217,0 °C), w przeciwieństwie do temperatury odpowiadającej maksimum pików, która ulega przesunięciu w kierunku wyższych wartości (217,7–220,9 °C) [29].

Analiza wpływu zmiany masy próbek preparatu na wyznaczoną czystość (rycina 8) wykazała, że zmiana masy naważek od 0,5 mg do 7,5 mg powoduje nieznaczną zmianę wyznaczonej wartości czystości (maksymalna różnica 0,13%). Wyniki jednoznacznie wykazały, że zmiany masy naważki próbki mają nieistotny wpływ na wyznaczone ekstrapolowane temperatury topnienia (216,7–217,1 °C) oraz temperatury maksimum pików (217,5–218,1 °C), które nie ulegają znaczącym zmianom. Inne badania wykazują, że wpływ masy próbki na wartość czystości może być różny, w zależności od użytej substancji [30].

Najważniejszą zaletą DSC jest możliwość przeprowadzenia badań bez konieczności wcześniejszego przygotowania badanego związku. Metoda ta jest prosta, szybka i tania. W przeciwieństwie do chromatografii DSC daje możliwość wykrywania zanieczyszczenia, które są strukturalnie podobne do głównego składnika. Równocześnie zwraca się uwagę na odpowiedni dobór zakresu krzywej DSC, na podstawie której po zastosowaniu równania van't Hoffa wyznacza się zawartość substancji w badanej próbce [5]. Zaleca się, aby wyznaczać czystość, stosując kilka metod jednocześnie, gdyż każda z nich różni się selektywnością względem zanieczyszczeń [31].

Badania do niniejszej pracy zostały wykonane w Pracowni Analizy Elementarnej i Badań Strukturalnych na Wydziale Farmaceutycznym z Oddziałem Analityki Medycznej, Uniwersytetu Medycznego im. Piastów Śląskich we Wrocławiu.

Pracę przygotowano w ramach realizacji zadania badawczego ujętego w temacie „Zastosowanie doświadczeń i teoretycznych metod analitycznych do badania związków organicznych ważnych w farmacji” z działalności statutowej na lata 2018–2019.

Otrzymano: 2018.05.09 · Zaakceptowano: 2018.06.12

Piśmiennictwo

1. ICH harmonised tripartite guideline specifications: Test procedures and acceptance criteria for biotechnological/biological products Q6B http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q6B/Step4/Q6B_Guideline.pdf (stan z 5.03.2018).
2. Hansen S., Pedersen-Bjergaard S., Rasmussen K.: International Pharmacopoeias, Regulations and guidelines. Hansen S., Pedersen-Bjergaard S., Rasmussen K.: Introduction to Pharmaceutical Chemical Analysis. Wyd. 1. Chichester John Wiley & Sons, Inc. 2012: 13–21.
3. WHO Expert Committee on Specifications for Pharmaceutical Preparations – WHO Technical Report Series, No. 885 – Thirty-fifth Report <http://apps.who.int/medicinedocs/en/d/Jh1792e/1.html> (stan z 5.02.2018).
4. The Japanese Pharmacopoeia. Seventeenth Edition. English Version 2016. The Ministry of Health, Labour and Welfare. 1.1–2.65 General tests, processes and apparatus. 2016: 25–98.
5. Yoshii K.: Application of Differential Scanning Calorimetry to the Estimation of Drug Purity: Various Problems and Their Solutions in Purity Analysis. Chem. Pharm. Bull., 1997, 45(2): 338–343.

6. Ma K., Wang H., Zhao M., Xing J.: Purity determination and uncertainty evaluation of theophylline by mass balance method, high performance liquid chromatography and differential scanning calorimetry. *Anal. Chim. Acta.* 2009, 650(2): 227–233.
7. Mathkar S., Kumar S., Bystol A., Olawoore K., Min D., Markovich R., Rustum A.: The use of differential scanning calorimetry for the purity verification of pharmaceutical reference standards. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2009, 49(3): 627–631.
8. Attia A.K., Abdel-Moety M.M.: Thermoanalytical Investigation of Terazosin Hydrochloride. *Adv. Pharm. Bull.*, 2013, 3(1): 147–152.
9. Araújo A.A.S., Santos Bezerra M., Storpirtis S., Rosário Matos J.: Determination of the melting temperature, heat of fusion, and purity analysis of different samples of zidovudine (AZT) using DSC. *Braz. J. Pharm. Sci.* 2010, 46(1): 37–43.
10. Riekes M.K., Pereira R.N., Rauber G.S., Cuffini S.L., de Campos C.E., Silva M.A., Stulzer H.K.: Polymorphism in nimodipine raw materials: Development and validation of a quantitative method through differential scanning calorimetry. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 2012, 70: 188–193.
11. Dalal N., Buckner I.S., Wildfong P.L.D.: Experimental Determination and Theoretical Calculation of the Eutectic Composition of Cefuroxime Axetil Diastereomers. *AAPS PharmSciTech.*, 2017, 18(7), 2570–2578.
12. Caviglioli G., Pani M., Gatti P., Parodi B., Cafaggi S., Bignardi G.: Study of retinoic acid polymorphism. *J. Pharm. Sci.*, 2006, 95(10): 2207–2221.
13. Abdel Rahman A.A., Eboutaleb A.E., Stamm, A., Samy E.M., Abdel-Rahman S.I.: Accelerated stability of ibuprofen-Eudragit RSPM sustained release tablets, IR and DSC solid stability testing. *J. Pharm. Belg.*, 1993, 48(6): 463–470.
14. Mazurek-Wadołkowska E., Winnicka K., Czajkowska-Kośnik A., Czyżewska U., Mityk W.: Application of differential scanning calorimetry in evaluation of solid state interactions in tablets containing acetaminophen. *Acta Pol. Pharm. – Drug Research.* 2013, 70(5): 787–793.
15. Blokhina S.V., Sharapova A.V., Ol'khovich M.V., Volkova T.V., Perlovich G.L.: Solubility, lipophilicity and membrane permeability of some fluoroquinolone antimicrobials. *Eur. J. Pharm. Sci.*, 2016, 93: 29–37.
16. Demetzos C.: Differential Scanning Calorimetry (DSC): A tool to study the thermal behavior of lipid bilayers and liposomal stability. *J. Liposome Res.*, 2008, 18(3): 159–173.
17. Garbett N.C., Mekmaysy C.S., DeLeeuw L., Chaires J.B.: Clinical application of plasma thermograms. Utility, practical approaches and considerations. *Methods*, 2015, 76: 41–50.
18. Garbett N.C., Mekmaysy C.S., Helm C.W., Jenson A.B., Chaires J.B.: Differential scanning calorimetry of blood plasma for clinical diagnosis and monitoring. *Exp. Mol. Pathol.*, 2009, 86(3): 186–191.
19. Keshmiri-Neghab H., Goliaei B., Saboury A.A., Moosavi-Movahedi A.A.: Overview on differential scanning calorimetry applications for early stage of cancers: brief report. *Tehran Univ. Med. J.*, 2016, 74(5): 371–375.
20. Steinhilber D., Schuber-Zsilavec M., Roth H.J.: CHEMIA MEDYCZNA. Schuber-Zsilavec M., Roth H.J.: Namnażanie się komórek i neoplazja. Wyd 2, Wrocław, MedPharm Polska, 2010: 515–517.
21. Bellur Atici E., Karliga B.: Quantitative determination of two polymorphic forms of imatinib mesylate in a drug substance and tablet formulation by X-ray powder diffraction, differential scanning calorimetry and attenuated total reflectance Fourier transform infrared spectroscopy. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 2015, 114: 330–340.
22. Grillo D., Polla G., Vega D.: Conformational Polymorphism on Imatinib Mesylate: Grinding Effects. *J. Pharm. Sci.*, 2012, 101(2): 541–551.
23. Srivastava A., Joshi B.D., Tandon P., Ayala A.P., Bansal A.K., Grillo D.: Study of polymorphism in imatinib mesylate: A quantum chemical approach using electronic and vibrational spectra. *Spectrochim. Acta A Mol. Biomol. Spectrosc.*, 2013, 103: 325–332.
24. Operating Instructions. DSC Apparatus. DSC 214 Polyma. System Components III, 2; Appendix V, 2. Przedruk za zgodą NETZSCH-Ge-rätebau GmbH.
25. ASTM international: Standard Test Method for Purity by Differential Scanning Calorimetry. Designation: E928–08. <https://www.astm.org/Standards/E928.htm> (stan z 18.02.2018).
26. Wesołowski M., Konarski T.: Metody analizy termicznej w badaniu reakcji substancji leczniczych w fazie stałej. *Farm. Pol.*, 1998, 54(3): 121–135.
27. Alves R., Reis T.V.S., Silva L.C.C., Storpirtis S., Mercuri L.P., Matos J.R.: Thermal behavior and decomposition kinetics of rifampicin polymorphs under isothermal and non-isothermal conditions. *Braz. J. Pharm. Sci.*, 2010, 48(2): 343–351.
28. Wesołowski M.: Różnicowa analiza termiczna (DTA) i różnicowa kalorymetria skaningowa (DSC) w analizie czystości substancji leczniczych. *Farm. Pol.*, 2003, 59(3): 105–114.
29. Van Dooren A.A., Müller B.W.: Influence of experimental variables on curves in differential scanning calorimetry. Part IV. Effects on peak-related temperatures and specific enthalpy. *Thermochim. Acta*, 1981, 49: 185–197.
30. Van Dooren, A.A., Müller, B.W.: Effects of experimental variables on purity determinations with differential scanning calorimetry. *Thermochim. Acta*. 1983, 66: 161–186.
31. Kestens V., Zeleny R., Auclair G., Held A., Roebben G., Linsinger T.P.J.: Differential scanning calorimetric method for purity determination: A case study on polycyclic aromatic hydrocarbons and chloramphenicol. *Thermochim. Acta*, 2011, 524: 1–6.