Ocena możliwości wykorzystania spektroskopii osłabionego całkowitego odbicia w podczerwieni (ATR-FTIR) w ocenie interakcji chemicznych chlorowodoru metforminy z wybranymi substancjami pomocniczymi

Agnieszka Płóciennik¹, Joanna Ronowicz¹

¹ Katedra Chemii Nieorganicznej i Analitycznej, Wydział Farmaceutyczny, Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu, Collegium Medicum im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy, Polska

Farmacja Polska, ISSN 0014-8261 (print); ISSN 2544-8552 (on-line)

Adres do korespondencji

Joanna Ronowicz, Katedra Chemii Nieorganicznej i Analitycznej, Wydział Farmaceutyczny, Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu, Collegium Medicum im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy, ul. Jurasza 2, 85-089 Bydgoszcz, e-mail: joanna.ronowicz@gmail.com

Źródła finansowania

Pracę zrealizowano w ramach działania naukowego Inicjatywa Doskonałości – Debiuty IDUB 2020-1-NZ-Ronowicz oraz PDB WF 514 (Wydział Farmaceutyczny CM UMK).

Konflikt interesów:

Nie istnieje konflikt interesów.

Otrzymano: 2020.08.03

Zaakceptowano: 2020.09.05

Opublikowano on-line: 2020.09.07

DOI

10.32383/farmpol/127278

ORCID

Joanna Ronowicz (ORCID iD: 0000-0002-7959-7924)

Agnieszka Płóciennik (ORCID iD: 0000-0002-5009-774X)

Copyright

© Polskie Towarzystwo Farmaceutyczne

To jest artykuł o otwartym dostępie,

na licencji CC BY NC

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>

Evaluation of the possibility of application of the Attenuated Total Reflectance spectroscopy (ATR-FTIR) in compatibility studies of metformin hydrochloride with selected excipients

The compatibility assessment of formulation ingredients is one of the key stages of research and development work on a new medicinal product. The submission of the results of chemical interaction studies is required in the registration dossier. Nevertheless, there are no clearly defined guidelines regarding the method of sample preparation and conditions for testing the compatibility of pharmaceutical raw materials.

The aim of the study was to assess the usefulness of the Attenuated Total Reflectance spectroscopy (ATR-FTIR) in the evaluation of chemical interactions of metformin hydrochloride with selected excipients in the solid phase. The use of the ATR-FTIR technique was considered due to its non-invasive nature, no need for special sample preparation, short time needed to register the infrared spectrum and a small amount of sample needed to perform the test.

The tested samples were two-component, equilibrium (1:1, w/w) mixtures of the active substance with the appropriate excipient (potato starch, ultraamylopectin, magnesium stearate, Methocel E15). In order to assess possible chemical interactions, spectroscopic tests were performed immediately after the mixtures were prepared and after their 3-month exposure to the temperature of 50°C and 50% RH humidity in a climatic chamber. ATR-FTIR spectra were recorded in the wavenumber range from 4000 cm⁻¹ to 600 cm⁻¹, with a resolution of 4 cm⁻¹. The detected changes in the ATR-FTIR spectra (such as absorption bands shifts, modifications in shape and intensity of bands, disappearance or appearance of additional absorption bands) indicated possible

changes in the chemical structure of metformin hydrochloride and thus a chemical interaction with tested excipients.

The research studies confirmed that the non-invasive and non-destructive ATR-FTIR technique can be valuable initial screening method in the physicochemical compatibility studies of metformin hydrochloride at the stage of defining the qualitative composition of the pharmaceutical formulation. However, full compatibility analysis of the pharmaceutical formulation ingredients requires the use of complementary techniques that verify the presence of changes in the chemical structure of the active substance.

Keywords: metformin hydrochloride, ATR-FTIR, compatibility studies.

© Farm Pol, 2020, 76 (7): 355–359

Ocena potencjalnych interakcji surowców farmaceutycznych jest niezwykle istotna na etapie prac formułacyjnych, podczas opracowywania nowego produktu leczniczego. Interakcje pomiędzy składnikami formułacji mogą mieć niekorzystne następstwa biofarmaceutyczne oraz rzutować na efekt terapeutyczny. Przedstawienie wyników badań zgodności wymagane jest w dokumentacji rejestracyjnej produktu leczniczego [1–2].

Pomimo ogromnego znaczenia testów zgodności substancji czynnej z substancjami pomocniczymi w przemyśle farmaceutycznym, wciąż brakuje jasnych wytycznych dotyczących warunków prowadzenia badań kompatybilności na etapie prac badawczo-rozwojowych nad nowym produktem leczniczym. Brak jest jednoznacznie sprecyzowanego sposobu przygotowania próbek oraz stosunku ilościowego poszczególnych składników w mieszaninach substancji czynnej z substancjami pomocniczymi. W literaturze opisywane są różne koncepcje postępowania, tj. z wykorzystaniem mieszanin dwuskładnikowych z równowagowym stosunkiem ilościowym API (ang. *Active Pharmaceutical Ingredient*, substancja czynna) i substancji pomocniczej (1:1 w/w) bądź z przewagą API lub substancji pomocniczej. Część badaczy do oceny kompatybilności składników formułacji przygotowuje mieszaniny wieloskładnikowe, których skład jakościowy i ilościowy odpowiada docelowo opracowywanej formułacji farmaceutycznej [3–10].

Rycina 1. Struktura chemiczna chlorowodoru metforminy.
Figure 1. A chemical structure of metformin hydrochloride.

Cel pracy

Celem pracy była ocena przydatności oraz możliwości wykorzystania metody spektroskopii całkowitego osłabionego odbicia w zakresie podczerwieni (ang. *Attenuated Total Reflectance spectroscopy*, ATR-FTIR) w badaniach interakcji chemicznych chlorowodoru metforminy z wybranymi substancjami pomocniczymi w fazie stałej. Rozważano wykorzystanie techniki ATR-FTIR z uwagi na jej nieinwazyjność, brak konieczności specjalnego przygotowania próbki do analizy, krótki czas potrzebny na rejestrację widma w zakresie podczerwieni oraz małą ilość próbki potrzebną do przeprowadzenia badania.

Materiał badany i metodyka badań

Substancję czynną stanowił chlorowodorek metforminy (**rycina 1**), badanymi substancjami pomocniczymi były skrobia ziemniaczana, ultraamylopektyna, stearynian magnezu oraz Methocel E15 (hydroksypropylometylceluloza).

Przygotowano mieszaniny dwuskładnikowe chlorowodoru metforminy z wybraną substancją pomocniczą (1:1, w/w). Mieszaniny poddano ekspozycji na warunki stresowe, tj. podwyższoną temperaturę 50°C oraz wilgotność 50% RH przez okres 3 miesięcy. Próbkę przechowywane były w kontrolowanych warunkach w komorze klimatycznej (Binder, model KBF P 240). Ekspozycja na czynniki stresowe miała na celu przyspieszenie procesów chemicznych i przemian fizycznych w badanych mieszaninach. Takie postępowanie pozwoliło wykryć interakcje niezidentyfikowane podczas badania bezpośrednio przygotowanych próbek dwuskładnikowych.

Ewentualne zmiany w strukturze chemicznej chlorowodoru metforminy monitorowano przy użyciu techniki odbiciowej ATR-FTIR. Badania spektroskopowe wykonano przy użyciu spektrofotometru FTIR 8400S (Shimadzu), wyposażonego w przystawkę MIRacle Single Reflection ATR (PIKE Technologies) z kryształem germanu. Zastosowano oprogramowanie IR Solutions (Shimadzu).

W celu oceny ewentualnych interakcji chemicznych, badania spektroskopowe przeprowadzono bezpośrednio po przygotowaniu mieszanin oraz po ich 3-miesięcznej ekspozycji na temperaturę 50°C i wilgotność 50% RH w komorze klimatycznej. Widma ATR-FTIR rejestrowano w skali absorbancji, w zakresie liczb falowych od 4000 cm⁻¹ do 600 cm⁻¹, z rozdzielczością 4 cm⁻¹. Dla każdej próbki wykonano 35 skanów w celu eliminacji szumów i przypadkowych zakłóceń. Analiza widm ATR-FTIR pozwoliła wnioskować o ewentualnych zmianach w strukturze chemicznej chlorowodoru

metforminy, a tym samym o interakcji chemicznej z badanymi substancjami pomocniczymi.

Analiza danych spektralnych

W widmie ATR-FTIR cząsteczki chlorowodoru metforminy (**rycina 2**) obecne są intensywne pasma w zakresie $1650\text{--}1500\text{ cm}^{-1}$ charakterystyczne dla drgań deformacyjnych wiązania N-H oraz drgań rozciągających wiązania C=N (b, c). Drgania rozciągające wiązania C-N powodują powstanie pasma w zakresie $1250\text{--}1020\text{ cm}^{-1}$ (e). Szerokie pasmo, pochodzące od drgań rozciągających wiązania N-H, pojawia się w zakresie liczb falowych $3600\text{--}3200\text{ cm}^{-1}$ (a). Pasma w zakresie $1470\text{--}1350\text{ cm}^{-1}$ pochodzą od drgań zginających wiązania C-H (d) [11–12].

Na **rycinach 3–6** przedstawiono widma absorpcyjne w zakresie IR zarejestrowane dla mieszanin chlorowodoru metforminy z badanymi substancjami pomocniczymi (przed oraz po ekspozycji na temp. 50°C oraz $50\% \text{ RH}$). W celu identyfikacji zmian w widmach mieszanin poddanych ekspozycji na temp. 50°C i wilgotność $50\% \text{ RH}$ dokonano ich zestawienia z wynikami analizy spektroskopowej przeprowadzonej bezpośrednio po przygotowaniu mieszanin dwuskładnikowych (**rycina 3–6**).

Analizując zarejestrowane widma oscylacyjno-rotacyjne koncentrowano się na identyfikacji zmian w położeniu pasm absorpcyjnych, mogących wskazywać na brak kompatybilności między składnikami badanych mieszanin. Zarejestrowane w widmach pasma absorpcyjne, występujące w konkretnym zakresie wartości liczb falowych przypisane są drganiom grup funkcyjnych, występujących w cząsteczce badanego związku chemicznego. Zanik pasm identyfikujących API, ich przesunięcie bądź modyfikacja kształtu pasm może wskazywać na zmiany w strukturze chemicznej substancji czynnej, w następstwie interakcji z substancją pomocniczą. Pojawienie się nowych pasm absorpcyjnych w widmie ATR-FTIR sugeruje tworzenie się nowych wiązań chemicznych między składnikami badanej mieszaniny.

Na **rycinie 3** można zaobserwować zmiany w widmie ATR-FTIR zarejestrowanym dla mieszaniny chlorowodoru metforminy z Methocel E15 (hydroksypropylometyloceluloza). Zmiany dotyczą pasma absorpcyjnego w zakresie $1650\text{--}1500\text{ cm}^{-1}$ charakterystycznego dla drgań wiązań N-H oraz C=N w cząsteczce metforminy. Zmiany obserwowane są również w zakresie liczb falowych $3600\text{--}3200\text{ cm}^{-1}$ charakterystycznym dla drgań rozciągających wiązania N-H.

W widmie ATR-FTIR mieszaniny chlorowodoru metforminy ze skrobią ziemniaczaną (**rycina 4**) odnotowano istotne modyfikacje kształtu pasm absorpcyjnych w przedziale liczb

Rycina 2. Widmo w zakresie IR zarejestrowane dla chlorowodoru metforminy.

Figure 2. IR spectrum recorded for metformin hydrochloride.

Rycina 3. Widma w zakresie IR zarejestrowane dla mieszaniny chlorowodoru metforminy z Methocel E15 (przed i po ekspozycji na temp. 50°C i $50\% \text{ RH}$) oraz dla czystych surowców farmaceutycznych.

Figure 3. IR spectra recorded for a mixture of metformin hydrochloride and Methocel E15 (before and after exposure to $50^{\circ}\text{C}/50\% \text{ RH}$) and for pure raw materials.

Rycina 4. Widma w zakresie IR zarejestrowane dla mieszaniny chlorowodoru metforminy ze skrobią ziemniaczaną (przed i po ekspozycji na temp. 50°C i $50\% \text{ RH}$) oraz dla czystych surowców farmaceutycznych.

Figure 4. IR spectra recorded for a mixture of metformin hydrochloride and potato starch (before and after exposure to $50^{\circ}\text{C}/50\% \text{ RH}$) and for pure raw materials.

Rycina 5. Widma w zakresie IR zarejestrowane dla mieszaniny chlorowodoru metforminy ze stearynianem magnezu (przed i po ekspozycji na temp. 50°C i 50% RH) oraz dla czystych surowców farmaceutycznych.

Figure 5. IR spectra recorded for a mixture of metformin hydrochloride and magnesium stearate (before and after exposure to 50°C/50% RH) and for pure raw materials.

Rycina 6. Widma w zakresie IR zarejestrowane dla mieszaniny chlorowodoru metforminy z ultraamylpektyną (przed i po ekspozycji na temp. 50°C i 50% RH) oraz dla czystych surowców farmaceutycznych.

Figure 6. IR spectra recorded for a mixture of metformin hydrochloride and ultraamylpectin (before and after exposure to 50°C/50% RH) and for pure raw materials.

falowych 1700–1500 cm⁻¹. Brak jest intensywnego pasma pochodzącego od drgań deformacyjnych wiązania N-H oraz drgań rozciągających wiązania C=N w cząsteczce metforminy (1650–1500 cm⁻¹). Poddanie mieszaniny warunkom stresowym spowodowało zmniejszenie intensywności sygnału w badanym zakresie liczb falowych.

Dla mieszanin chlorowodoru metforminy ze skrobią ziemniaczaną i Methocelem E15 po ekspozycji na czynniki stresowe (temp. 50°C oraz 50% RH) wykazano dodatkowe zmiany w obrazie widma ATR-FTIR. Zmian tych nie obserwowano bezpośrednio po przygotowaniu wyżej wymienionych mieszanin. Sugeruje to, że warunki stresowe mogą przyspieszać zmiany w strukturze chemicznej substancji czynnej.

Analiza położenia pasm absorpcyjnych w widmie IR zarejestrowanym dla mieszaniny chlorowodoru metforminy ze stearynianem magnezu (**rycina 5**) oraz ultraamylpektyną (**rycina 6**) wskazuje na interakcję chemiczną tych surowców farmaceutycznych. Interakcję tę zaobserwowano już po bezpośrednim zmieszaniu surowców. Ekspozycja na warunki stresowe nie przyczyniła się do pojawienia się dodatkowych zmian w widmach ATR-FTIR. Zarejestrowane w widmach (**rycina 5 i 6**) zmiany w obrazie pasm absorpcyjnych dotyczą zakresów liczb falowych: 1650–1500 cm⁻¹, 1470–1350 cm⁻¹, 1250–1020 cm⁻¹ oraz 3600–3200 cm⁻¹ charakterystycznych dla drgań wiązań obecnych w cząsteczce metforminy (N-H, C=N, C-H, C-N).

Dyskusja wyników

Technika ATR-FTIR jest nieinwazyjną i niedestrukcyjną metodą analityczną, pozwalającą na ocenę tożsamości badanych związków chemicznych. Zmiany w obrazie widma polegające na przesunięciach pasm absorpcyjnych, zaniku pasm lub pojawieniu się nowych pasm wskazują na zmianę w strukturze chemicznej badanego związku.

Przechowywanie mieszanin w komorze klimatycznej (50°C, 50% RH) może istotnie przyspieszyć, a w konsekwencji ułatwić rejestrację zmian w strukturze chemicznej substancji czynnej, zmian będących wynikiem interakcji chemicznej między cząsteczką chlorowodoru metforminy a substancją pomocniczą. Niekiedy dopiero ekspozycja mieszaniny na warunki stresowe może być istotnym czynnikiem pozwalającym na wykrycie niezgodności niezidentyfikowanych podczas badania próbek bezpośrednio po ich przygotowaniu. Ekspozycja na podwyższoną temperaturę przyspiesza reakcje chemiczne prowadzące do zmian w strukturze substancji czynnej.

Analiza zarejestrowanych w pracy widm ATR-FTIR potwierdziła – opisaną w literaturze – niezgodność chemiczną chlorowodoru metforminy ze skrobią ziemniaczaną, stearynianem magnezu oraz hydroksypropylometylocelulozą (Methocel E15). Przeprowadzona analiza spektroskopowa wykazała również niezgodność chlorowodoru metforminy z ultraamylpektyną.

Wskazana byłaby weryfikacja wyników badań kompatybilności uzyskanych w analizie spektroskopowej przy użyciu technik komplementarnych, jak spektroskopia ramanowska, różnicowa kalorymetria skaningowa czy analiza chromatograficzna, pozwalająca na jednoczesną identyfikację oraz oznaczenie produktów degradacji chlorowodoru metforminy.

Niewątpliwą zaletą metody ATR-FTIR jest jej nieinwazyjność, łatwość wykonania pomiaru, krótki czas analizy oraz mała ilość próbki niewymagającej specjalnego przygotowania do wykonania pomiaru. Z kolei ograniczeniem wykorzystania metody ATR-FTIR w badaniach kompatybilności składników formulacji może być pojawiająca się niejednokrotnie trudność w interpretacji widm mieszanin, wynikająca z nakładania się pasm absorpcyjnych. Interpretacja danych spektroskopowych może wymagać wówczas użycia algorytmów chemometrycznych w celu ekstrakcji istotnej farmaceutycznej informacji z obrazu widm.

Wnioski

Technika ATR-FTIR może stanowić wstępną metodę przesiewową w badaniach zgodności fizykochemicznej surowców farmaceutycznych w fazie stałej. Z uwagi na swoją nieinwazyjność, metoda wpisuje się w, aktualnie rekomendowaną przez agencje rejestracyjne na etapie prac badawczo-rozwojowych, koncepcję *Quality by Design* [13–14]. Pełna analiza kompatybilności składników opracowywanej formulacji farmaceutycznej wymaga jednak użycia technik komplementarnych, weryfikujących obecność zmian w strukturze chemicznej substancji czynnej.

Autorzy pracy kierują serdeczne podziękowania do pana prof. dr hab. n. farm. Michała Marszałła oraz pana dr n. farm. Adama Sikory z Katedry Chemii Leków Wydziału Farmaceutycznego CM UMK za udostępnienie komory klimatycznej Binder.

Piśmiennictwo

1. ICH M4Q (R1), The Common Technical Document For The Registration Of Pharmaceuticals For Human Use: Quality, 2002.
2. Patel P. Preformulation studies: An integral part of formulation design, [w:] Ahmad U., Akhtar J. (red.), *Pharmaceutical Formulation Design – Recent Practices*. *IntechOpen* 2020; 1–15.
3. Ledeti I, Bolintineanu S, Vlase G, Circioban D, Ledeti A, Vlase T, Suta LM, Caunii A, Murariu M. Compatibility study between antiparkinsonian drug Levodopa and excipients by FTIR spectroscopy, X-ray diffraction and thermal analysis. *J. Therm. Anal. Calorim.* 2017; 130: 433–441.
4. Earle RR, Bandaru KK, Usha L. Formulation and characterization of sustained release coated matrix granules of metformin hydrochloride. *Asian J. Pharm. Clin. Res.* 2018; 11: 387–392.
5. Bruni G, Berbenni V, Milanese Ch, Girella A, Marini A. Drug-excipient compatibility studies in binary and ternary mixtures by physico-chemical techniques. *J. Therm. Anal. Calorim.* 2010; 102: 193–201.
6. Macêdo RO, Gomes do Nascimento T, Veras JWE. Compatibility and stability studies of propranolol hydrochloride binary mixtures and tablets for TG and DSC-photovisual. *J. Therm. Anal. Calorim.* 2002; 67: 483–489.
7. Cunha-Filho SSM, Martinez-Pacheco R., Landin M. Compatibility of the antitumor beta-lapachone with different solid dosage forms excipient. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2007; 45: 590–598.
8. Rosasco MA, Bonafede SL, Faudone SN, Segall AI. Compatibility study of tobramycin and pharmaceutical excipients using differential scanning calorimetry, FTIR, DRX, and HPLC. *J. Therm. Anal. Calorim.* 2018; 1–13.
9. Ledeti I, Romanescu M, Circioban D, Ledeti A, Vlase G, Vlase T, Suciu O, Murariu M, Olariu S, Buda MP, Piciu V. Stability and compatibility studies of levothyroxine sodium in solid binary systems – instrumental screening. *Pharmaceutics* 2020; 58: 1–14.
10. Jamieson L, Byrne H. Vibrational spectroscopy as a tool for studying drug-cell interaction: could highthroughput vibrational spectroscopic screening improve drug development. *Vib. Spectrosc.* 2017; 91: 16–30.
11. Ramalingam P, Padmanabha Reddy Y, Vinod Kumar K, Babu Rao Chandu, Rajendran K. Evaluation of metformin hydrochloride in Wistar rats by FTIR-ATR spectroscopy: A convenient tool in the clinical study of diabetes. *J. Nat. Sci. Biol. Med.* 2014; 5(2): 288–292.
12. Sheela NR, Muthu S, Krishnan SS. FTIR, FT Raman and UV-Visible Spectroscopic Analysis on Metformin Hydrochloride. *Asian J. Chem.* 2010; 22(7): 5049–5056.
13. Yu LX, Amidon G, Khan MA, Hoag SW, Polli J, Raju GK, Woodcock J. Understanding Pharmaceutical Quality by Design. *AAPS Journal* 2014; 16: 771–783.
14. ICH Q8(R2), *Pharmaceutical Development* 2009.