

Katarzyna Dettlaff

**Badania trwałości radiochemicznej pochodnych azolu
o działaniu przeciwgrzybiczym**

Rozprawa doktorska

Poznań, 2010

Promotorowi

Pani Prof. dr hab. Barbarze Marciniac

za pomoc w wyborze interesującego tematu

przekazaną wiedzę i doświadczenie,

okazaną życzliwość i wyrozumiałość,

poświęcony czas, cenne wskazówki i pomoc

w czasie realizacji i redagowania pracy

serdecznie dziękuję

Pani Prof. dr hab. Mariannie Zajac

oraz

Pani Prof. dr hab. Annie Jelińskiej

serdecznie dziękuję

za umożliwienie wykonania pracy

Wszystkim Koleżankom i Kolegom

z Katedry Chemii Farmaceutycznej

za pomoc i życzliwość w trakcie realizowania pracy

składam serdeczne podziękowania

Mojej Mamie

1. Wprowadzenie	1
2. Cel pracy	6
3. Część teoretyczna	7
3.1. Leczenie grzybic – rys historyczny	7
3.2. Otrzymywanie badanych pochodnych azolu	14
3.3. Farmakologia pochodnych azolu	17
3.3.1. Mechanizm działania	17
3.3.2. Metabolizm	19
3.4. Metody analityczne i badania trwałości pochodnych azolu – przegląd piśmiennictwa	23
4. Część doświadczalna	32
4.1. Materiał do badań	32
4.2. Odczynniki i substancje wzorcowe	34
4.3. Aparatura badawcza	35
4.4. Metodyka badań	36
4.4.1. Przygotowanie próbek	36
4.4.2. Ekspozycja na promieniowanie jonizujące	36
4.4.3. Analiza wagowa	37
4.4.4. Analiza organoleptyczna	37
4.4.5. Pomiar pH	37
4.5. Metody badań	37
4.5.1. Metody bezpośrednie	37
4.5.1.1. Skaningowy mikroskop elektronowy (SEM)	37
4.5.1.2. Dyfrakcja promieniowania rentgenowskiego (XRD)	37
4.5.1.3. Różnicowa kalorymetria skaningowa (DSC)	38
4.5.1.4. Spektrofotometria w podczerwieni (FT-IR)	38
4.5.1.5. Spektrometria mas (MS)	38
4.5.1.6. Spektrometria elektronowego rezonansu magnetycznego (EPR)	38
4.5.2. Metody pośrednie	39
4.5.2.1. Spektrofotometria w nadfiolecie (UV)	39
4.5.2.2. Spektrometria jądrowego rezonansu magnetycznego (NMR)	42
4.5.2.3. Chromatografia cienkowarstwowa (TLC)	42

Spis treści

4.5.2.4. Chromatografia cieczerw (HPLC)	43
4.5.2.5. Chromatografia cieczerw łączona ze spektrometrią mas (HPLC-MS)	44
4.6. Wyniki	45
4.6.1. Metody bezpośrednie	45
4.6.1.1. Analiza wagowa	45
4.6.1.2. Analiza organoleptyczna	46
4.6.1.3. Ogląd mikroskopowy (SEM)	48
4.6.1.4. Analiza rentgenograficzna (XRD)	49
4.6.1.5. Analiza kalorymetryczna (DSC)	50
4.6.1.6. Analiza w podczerwieni (FT-IR)	55
4.6.1.7. Wyniki spektrometrii mas (MS)	57
4.6.1.8. Analiza metodą EPR	71
4.6.2. Metody pośrednie	74
4.6.2.1. Wyniki pomiarów pH	74
4.6.2.2. Analiza w nadfiolecie (UV)	74
4.6.2.3. Analiza metodą NMR	79
4.6.2.4. Analiza metodą TLC	87
4.6.2.5. Analiza metodą HPLC	89
4.6.2.6. Analiza metodą HPLC-MS	94
5. Dyskusja wyników	107
6. Wnioski	123
7. Streszczenie	124
8. Spis rycin tabel	128
9. Piśmiennictwo	131

Skróty używane w pracy:

CL - klotrymazol

FK - flukonazol

KK - ketokonazol

MK - mikonazol (w formie azotanu)

SAL (ang. *Steerility Assurance Level*) współczynnik poziomu zapewnienia sterylności

OTC (ang. *Over The Counter*) leki wydawane w aptekach bez recepty lekarskiej

DAK N-deacetyloketokonazol

FMO monooksydaza flawinowa

NADPH forma zredukowana kationu fosforanowego dinukleotydu

HPLC (ang. *High Performance Liquid Chromatography*) wysokosprawna chromatografia cieczowa

DAD (ang. *Diode Array Detector*) detektor z matrycą fotodiodową, najpopularniejszy detektor w chromatografach HPLC

t_R (ang. *Retention Time*) czas retencji

GC (ang. *Gas Chromatography*) chromatografia gazowa

TLC (ang. *Thin Layer Chromatography*) chromatografia cienkowarstwowa

R_f (ang. *Retention Factor*)- współczynnik opóźnienia

UV (ang. *Ultra Violet*) – ultrafiolet, spektrofotometria w nadfiolecie

„peak-zero” technika pomiarowa używana w spektroskopii pochodnych. Pomiar są wykonywane od maksimum pik do linii podstawowej (P-0), inną możliwością rejestracji pomiaru jest metoda pik do pik.

FT-IR (ang. *Fourier Transform Infrared Spectroscopy*) – podczerwień, spektroskopia w podczerwieni z transformacją Fouriera

NMR (ang. *Nuclear Magnetic Resonance*) spektrometria magnetycznego rezonansu jądrowego

TMS tetrametylosilan

DEPT (ang. *Distortionless Enhancement by Polarization Transfer*) bezzakłócenioowe wzmocnienie sygnału (jąder niskoczułych) poprzez transfer polaryzacji (od jądra "wysokoczułego" - najczęściej protonu). Technika rejestracji widm ¹³C-NMR umożliwia określenie rzędowości atomów węgla.

Skróty używane w pracy

- COSY** (ang. *CORrelation SpectroscopY*) - spektroskopia korelacyjna, dwuwymiarowa technika pozwalająca na korelowanie sygnałów pochodzących od jąder tego samego pierwiastka, oddalonych o nie więcej niż trzy wiązania, czyli takich, które są ze sobą sprzężone. Jest to najprostsza sekwencja dwuwymiarowa, zaproponowana przez Jeenera a po raz pierwszy zastosowana w praktyce przez R.R. Ernsta (laureata Nagrody Nobla za wkład w rozwój spektroskopii NMR).
- HETCOR** (ang. *HETeromuclear CORrelation*) - eksperyment z korelacją hetero jądrową stosowany w metodzie NMR. Jest to technika bezpośrednia, dzięki której otrzymuje się korelacje ^{13}C - ^1H (ogólnie X-1H).
- Rozszczepienia sygnałów spowodowane sprzężeniami spinowo-spinowymi:
s - singlet, d - dublet, t - triplet, q - kwartet, m- multiplet
- EPR** (ang. *Electron Paramagnetic Resonance*) spektroskopia elektronowego rezonansu paramagnetycznego
- DSC** (ang. *Differential Scanning Calorimetry*) skaningowa kalorymetria różnicowa
- T_{onset}** temperatura początku piku topnienia
- T_{max}** temperature maksimum piku topnienia
- XRD** (ang. *X-ray Diffraction*) dyfrakcja rentgenowska, dyfrakcja promieni X
- SEM** (ang. *Scanning Electron Microscope*) elektronowy mikroskop skaningowy
- G** wydajność radiolityczna
- CID** rozpad pobudzony przez kolizję
- WWA** wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne (z ang. *Polycyclic Aromatic Hydrocarbons PAH*)

Walidacja metod:

- $\alpha_{1cm}^{1\%}$ współczynnik absorpcji właściwej
- \bar{x} średnia arytmetyczna
- s odchylenie standardowe
- W_z współczynnik zmienności
- $s_{\bar{x}}$ odchylenie standardowe średniej arytmetycznej
- Δx błąd względny
- μ przedział ufności
- a nachylenie prostej
- b współczynnik przesunięcia
- r współczynnik korelacji
- s_a błąd standardowy współczynnika kierunkowego
- s_b błąd standardowy współczynnika przesunięcia
- s_y odchylenie standardowe punktu od prostej
- t_a i t_b współczynniki istotności regresji
- LOD** (ang. *Limit Of Detection*) granica wykrywalności
- LOQ** (ang. *Limit Of Quantitation*) granica oznaczalności

1. Wprowadzenie

Problem grzybicy u ludzi opisał po raz pierwszy Hipokrates już w V w. n.e [1], lecz za początki mikologii lekarskiej uznaje się lata czterdzieste XIX wieku, kiedy to zaczęto szerzej korzystać z mikroskopu [2]. Do drugiej połowy XIX wieku grzyby zaliczane były do roślin, obecnie stanowią osobne królestwo [3,4]. Dzieli się ono na 3 grupy (podkrólestwa): grzyborośla (Mycoprotocista), grzybobpływki (Chromista), i grzyby właściwe (Fungi). Szacuje się, że na naszej planecie jest ponad 250 tysięcy gatunków grzybów, a tylko około 200 gatunków może spowodować chorobę u człowieka [5], natomiast pozostałe żyją niezależnie od ludzi i zwierząt.

W ostatnim półwieczu odnotowujemy nieustanny wzrost różnego rodzaju infekcji grzybiczych i w większości są to infekcje oportunistyczne i egzogenne, czyli takie, które u osób z prawidłowo funkcjonującym układem odpornościowym by nie wystąpiły [6].

Przyczynami tej sytuacji są:

- popularność antybiotykoterapii, w tym stosowanie nowych antybiotyków o coraz szerszym zakresie działania, zarówno w terapii jak też w profilaktyce [7],
- powszechność inwazyjnych form leczenia i diagnostyki, żywienie pozajelitowe,
- osłabienie organizmów przez występowanie alergii, cukrzycy i nowotworów,
- celowe osłabianie układu odpornościowego (rozwój transplantologii) [8,9],
- osłabienie odporności jako wynik zakażeń wirusem HIV [7].

Z powyższych powodów zakażenia grzybicze, szczególnie szpitalne są poważnym zagrożeniem dla pacjentów szczególnie oddziałów intensywnej terapii, chirurgii, oraz oddziałów leczenia oparzeń. Śmiertelność w wyniku takich powikłań jest wysoka [8-11].

Zakażenia grzybicze można podzielić na zakażenia miejscowe (np. grzybice stóp czy paznokci) oraz zakażenia układowe, do których dochodzi poprzez drogę oddechową, pokarmową lub na skutek penetracji przez uszkodzoną skórę. Najczęstszymi grzybicami układowymi są: zakażenia płuc grzybami *Histoplasma capsulatum*, *Coccidioides immitis*, *Blastomyces dermatidis*, *Paracoccidioides brasiliensis* oraz kandydoza układu pokarmowego (*Candida spp.*) [7].

Czynnikiem powodującym, iż leczenie grzybic jest trudniejsze od leczenia infekcji bakteryjnych jest ich budowa, m.in. obecność chitynowej ściany, blokującej dostęp do

wnętrza komórki oraz zdolność tych organizmów do wytwarzania enzymów lipolitycznych i hydrolitycznych.

Aktualnie do leczenia grzybic dysponujemy całym arsenałem chemioterapeutyków, które można podzielić ze względu na mechanizm działania na:

- tworzące kompleksy z błonowo związanymi sterolami,
- hamujące przebieg mitozy, poprzez blokowanie mikrotubul,
- zakłócające biosyntezę ergosterolu:
 - inhibitory skwalenoepoksydazy,
 - inhibitory lanosterolo-14 α -demetylazy (pochodne azolu),
 - inhibitory Δ_{14} -reduktazy i $\Delta_{8 i 7}$ -izomerazy,
- hamujące tymidylosyntazę,
- i inne [12].

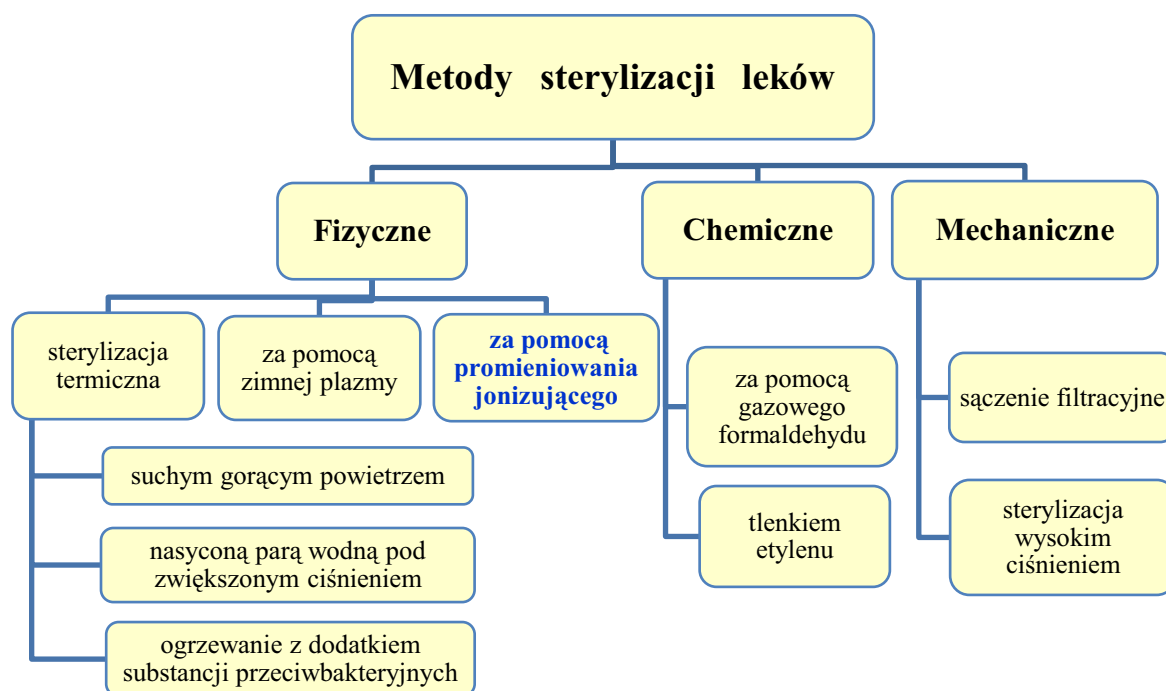
Leki przeciwgrzybicze muszą spełniać określone przez farmakopeę wymagania dotyczące jakości m.in. zawartości i czystości chemicznej oraz mikrobiologicznej. Tak jak dla innych leków, poziom ich czystości mikrobiologicznej jest związany z drogą podania i postacią leku [13,14].

Do pierwszej kategorii czystości, czyli grupy, dla której wymagana jest jałowość, należą leki podawane pozajelitowo (wlewy dożylny, iniekcje), leki oczne oraz stosowane na rany i rozległe oparzenia. Lek jałowy to produkt pozbawiony drobnoustrojów oraz ich form przetrwalnikowych. Należy zwrócić uwagę, iż żaden sposób sterylizacji nie zapewnia całkowitej, stuprocentowej jałowości. Wynika to z faktu, iż zmniejszanie liczby drobnoustrojów przebiega w sposób wykładniczy i nigdy nie osiąga poziomu zerowego. Z tego powodu wprowadzony został współczynnik poziomu zapewnienia sterylności SAL (*Stearility Assurance Level*) i zgodnie z przyjętymi normami farmakopealnymi za jałowy uznaje się lek, dla którego na milion mikroorganizmów przed procesem sterylizacyjnym zachował się jeden o ograniczonej zdolności rozwojowej. Inaczej mówiąc produktem sterylnym jest produkt, dla którego $SAL \leq 10^{-6}$ [14-17].

Leki przeciwgrzybicze pochodne azolu, które są tematem tej rozprawy, występują w wielu różnych postaciach, w tym także produktach należących do pierwszej kategorii czystości np.: flukonazol w iniekcjach *Diflucan* (2mg/1ml 50 i 100 ml), *Flumycon* (2mg/1ml 50 i 100 ml) i *Mycamax* (2mg/1ml 100 ml), czy też klotrymazol w maści do oczu *Clotrimazolium* (1%, 3 g). Wciąż jednak trwają prace nad nowymi postaciami leków

przeciwgrzybiczych np. kroplami do oczu z flukonazolem [18,19] oraz nad roztworami do podań dożylnych z azotanem mikonazolu [20].

W związku z występowaniem grzybic, jako zakażeń oportunistycznych u chorych z osłabioną odpornością, z rozległymi ranami i oparzeniami, wydaje się właściwe, aby leki należące standardowo do drugiej klasy czystości, czyli preparaty do stosowania miejscowego takie jak kremy, maści, roztwory itp. też charakteryzowały się jałowością. Dlatego potrzebne są zwalidowane metody sterylizacji tych związków leczniczych, a można je podzielić [13-15], ze względu na charakter czynnika wyjaławiającego, na następujące grupy przedstawione na Ryc. 1.



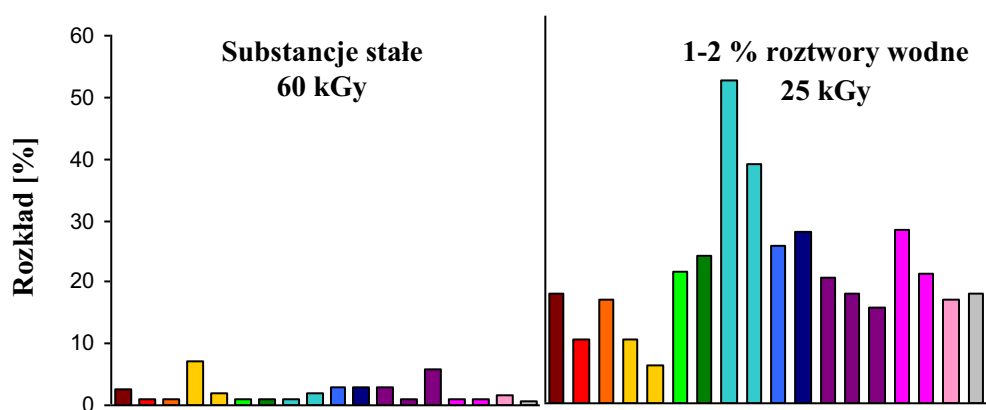
Ryc. 1. Metody sterylizacji substancji i produktów leczniczych [13-15]

Jedną z dopuszczonych przez farmakopee metod wyjaławiania i dekontaminacji jest metoda radiacyjna, wykorzystująca promieniowanie gamma, beta oraz wiązkę wysokoenergetycznych elektronów z akceleratora. Właściwości bakteriobójcze promieniowania polegają na uszkodzeniu materiału genetycznego oraz białek mikroorganizmów, co prowadzi do zahamowania ich czynności życiowych. Mechanizm oddziaływania promieniowania jonizującego z drobnoustrojami może być bezpośredni, polegający na wybiciu elektronu z makrocząsteczek komórkowych i generowaniu reaktywnych wolnych rodników lub pośredni polegający na powstawaniu wysoce reaktywnych produktów radiolizy wody, które zapoczątkowują reakcje następcze prowadzące do efektu letalnego [21].

W ostatnich latach metoda sterylizacji radiacyjnej jest coraz bardziej popularna w Europie i na świecie [17,22,23]. Niewątpliwie dla tych licznych zalet, z których najistotniejsze to:

- niezawodność i oddziaływanie na wszystkie rodzaje drobnoustrojów,
- przeprowadzanie procesu w dowolnej temperaturze,
- brak pozostałości po napromieniowaniu,
- łatwość penetracji głębinowej,
- możliwość sterylizacji w dowolnym opakowaniu,
- zmniejszenie ryzyka wtórnej kontaminacji produktu,
- łatwość monitorowania i kontrolowania procesu,
- szybkość i powtarzalność procesu.

Niestety, mimo, że uważana za najlepszą z metod wyjaławiania, sterylizacja radiacyjna posiada także szereg wad, a jej podstawowym ograniczeniem jest możliwość uszkodzenia fizycznego lub chemicznego wyjaławianego leku. Zachodzące podczas napromieniowywania uszkodzenia bądź zmiany związane są przede wszystkim z powstawaniem wolnych rodników, które mogą zapoczątkowywać reakcje łańcuchowe i prowadzić do tworzenia trwałych produktów rozkładu, w tym izomerów optycznych czy strukturalnych. Szczególnie reaktywne, niszczące strukturę związku leczniczego są produkty radiolizy wody (m.in. H_2O^+ , $\cdot\text{OH}$, H_3O^+ , $\text{H}\cdot$, $\text{O}\cdot$, H_2 , e^- , e_{aq}^-), dlatego też dokonuje się sterylizacji leków głównie w stanie stałym [24-27]. Na Ryc. 2. porównano rozkład wybranych leków sterylizowanych w formie stałej i w postaci roztworów wodnych [26]



Ryc. 2. Porównanie rozkładu substancji stałych i roztworów wodnych [26]

Od lewej: siarczan atropiny, chlorowodorek kokainy, fosforan kodeiny, chlorowodorek efedryny, chlorowodorek hydrokodonu, wodorowinian hydrokodonu, wodorowinian hydromorfonu, lewometadon, chlorowodorek metadonu, chlorowodorek morfiny, chlorowodorek oksykodonu, chlorowodorek pilokarpiny i bromowodorek skopolaminy.

Do częstych zmian obserwowanych w lekach poddanych sterylizacji radiacyjnej w stanie stałym należą:

- powstawanie wolnych rodników [27-30],
- powstawanie defektów w sieci krystalicznej [27,32,33],
- zabarwienia [31-33]
- zmianę postaci (w tym postaci polimorficznej) [33],
- wzrost lub spadek skręcalności optycznej [34],
- obniżenie temperatury topnienia [32,35-38]
- powstawanie produktów radiolizy [33,35,37-39].

Z powyższych powodów należy wykonać szereg badań porównawczych leku napromieniowanego równoległe z lekiem nienapromieniowanym, aby określić czy i jakie zmiany zachodzą w nim w wyniku napromieniowania, czyli określić jego trwałość radiochemiczną. Pomimo, iż standardową dawką stosowaną w sterylizacji substancji leczniczych jest dawka 25 kGy [13-16], w tego typu badaniach wykorzystuje się także kilkakrotnie wyższe dawki [16,31,32,35-38]. Celem takiego postępowania jest zintensyfikowanie wszystkich zmian zachodzących w leku m.in. zwiększenie zawartości produktów radiolizy, dla ich identyfikacji oraz aby ustalić mechanizm degradacji.

W dostępnej literaturze nie znaleziono odpowiedzi na pytanie czy pochodne azolu o działaniu przeciwgrzybiczym (flukonazol, klotrymazol, ketokonazol i azotan mikonazolu) są lekami odpornymi na działanie promieniowania jonizującego i czy mogą być sterylizowane metoda radiacyjną w fazie stałej.

Wyniki niniejszej rozprawy mają udzielić odpowiedzi na obydwa te pytania, a także na wiele innych związanych z trwałością radiochemiczną pochodnych azolu.

2. Cel pracy

Celem mojej pracy było określenie wpływu promieniowania jonizującego na właściwości fizykochemiczne czterech pochodnych azolu o działaniu przeciwgrzybiczym w fazie stałej.

Do badań wybrano :

- flukonazol
- klotrymazol,
- ketokonazol,
- mikonazol (w formie azotanu).

Powyższe związki poddano napromieniowaniu różnymi dawkami (25 – 800 kGy) za pomocą wiązki wysokoenergetycznych elektronów z akceleratora, a następnie analizowano za pomocą metod spektroskopowych (UV, FT-IR, NMR, EPR, MS), chromatograficznych (TLC, HPLC), kalorymetrycznych (DSC), organoleptycznych i innych (SEM, XRD), co umożliwiło przeprowadzenie oceny jakościowej i ilościowej procesu radiodegradacji.

W pierwszej kolejności przeprowadzono badania analityczne z wykorzystaniem metod bezpośrednich, tzn. takich, które nie wymagały wstępnego przygotowania próbki (np. rozpuszczania), w drugiej kolejności zastosowano metody pośrednie, wymagające zmiany stanu skupienia próbki badanego leku lub innych specjalnych przygotowań.

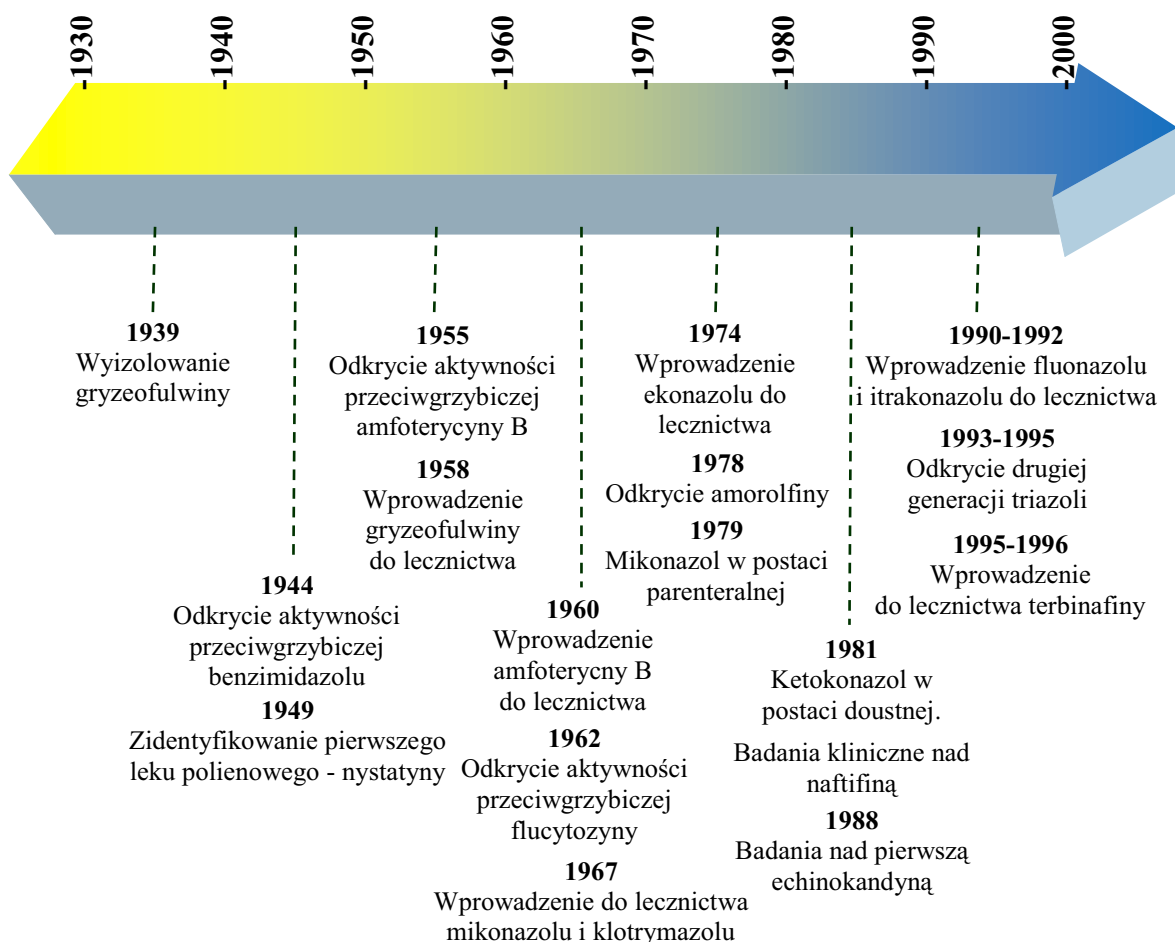
Osiągnięcie założonego celu badań powinno było możliwe dzięki zrealizowaniu następujących zadań badawczych:

1. Określenie wpływu promieniowania jonizującego na właściwości badanych leków w dawce 25 kGy, czyli zwykle stosowanej do sterylizacji radiacyjnej [13,14,16];
2. Zbadanie mechanizmów oddziaływania promieniowania jonizującego z badanymi lekami poprzez zastosowanie wyższych dawek promieniowania i wykrycie wszystkich zachodzących zmian:
 - a. określenie zmian we właściwościach fizykochemicznych badanych leków,
 - b. wykrycie, rozdzielenie, zidentyfikowanie i oznaczenie powstających produktów rozkładu,
 - c. zaproponowanie mechanizmu radiodegradacji;
3. Przeprowadzenie analizy porównawczej i korelacyjnej otrzymanych wyników:
 - a. ocena trwałości radiochemicznej badanych pochodnych,
 - b. ocena możliwości sterylizacji radiacyjnej badanych związków.

3. Część teoretyczna

3.1. Leczenie grzybic – rys historyczny

Dynamiczny rozwój lecznictwa grzybic datuje się od połowy XX wieku, kiedy zostały wprowadzone do lecznictwa antybiotyki polienowe (nystatyna, natamycyna i amfoterycyna B) [7]. Niestety, nystatyna i natamycyna nie wchłaniały się z przewodu pokarmowego i dlatego znalazły zastosowanie jedynie w leczeniu miejscowym przy grzybicach skóry i błon śluzowych. W roku 1955 wyizolowano z promieniowca *Streptomyces nodosus* amfoterycynę B i udowodniono jej skuteczność przeciwgrzybiczą *in vitro*. Jednak substancja ta dopiero po modyfikacji chemicznej polegającej na połączeniu z dezoksycholanem sodu, została wprowadzona do lecznictwa [40] w postaci roztworów dożylnych (preparat Fungizon), co było przełomem w leczeniu ciężkich postaci grzybic Ryc. 3.



Ryc. 3. Kluczowe wydarzenia w rozwoju leków przeciwgrzybiczych [40]

Dzięki swej skuteczności amfoterycyna B nadal jest stosowana i nazywana „złotym standardem” leczenia grzybic [40,41]. Niestety, charakteryzuje się także dużą toksycznością i przy stosowaniu ogólnym może wykazywać wiele objawów niepożądanych, w tym poważne zaburzenia układu sercowo-naczyniowego, uszkodzenie nerek i szpiku kostnego. Poza tym wzmaga toksyczne działanie glikozydów nasercowych i środków zwiotczających [40,42].

Badania nad substancjami o potencjalnym działaniu przeciwgrzybiczym nie ustawały. Za kolejne ważne wydarzenie uważa się odkrycie Jamesa Gentlesa [42,43], polegające na wykazaniu działania przeciwgrzybiczego gryzeofulwiny po podaniu doustnym.

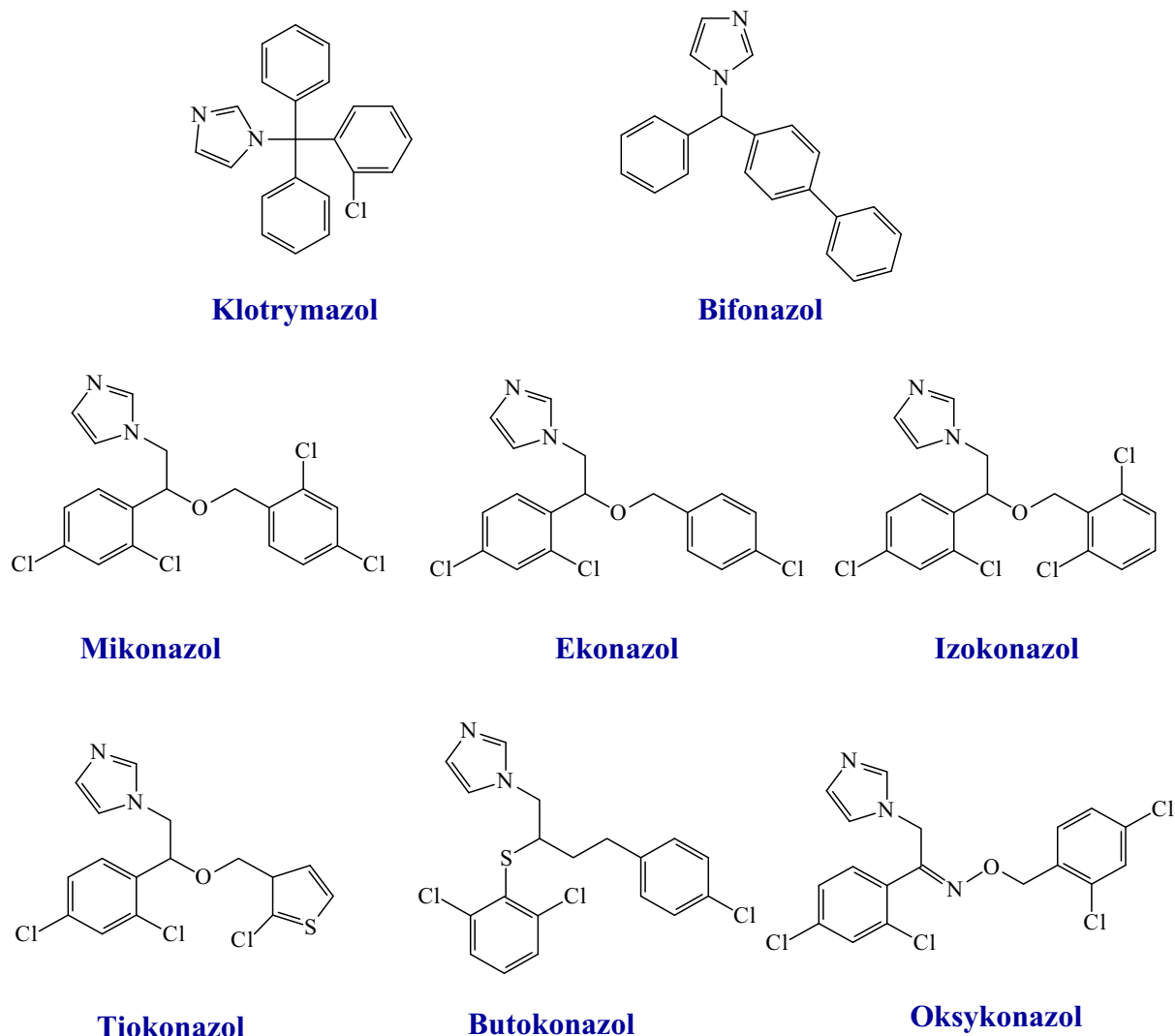
Jednak dopiero synteza pochodnych azolowych, dzięki ich skuteczności, a za razem wysokiego współczynnika terapeutycznego otworzyła nowy etap w leczeniu grzybic nazywany często erą leków azolowych [44].

W 1958 roku opublikowano pracę o właściwościach substancji leczniczej pochodnej benzimidazolu (1-p-chlorobenzyl-2-metylobenzimidazol), a dekadę później (1969 r.) została wprowadzona do lecznictwa „wielka dwójka” czyli klotrymazol pod nazwą Canestan® (Bayer AG, Niemcy) oraz mikonazol w postaci azotanu pod nazwą Daktarin® (Janssen Pharmaceutica, Belgia) [45,46]. Zakres ich działania obejmował grzybicę skóry i błon śluzowych. Kolejność wprowadzania do lecznictwa najważniejszych leków przeciwgrzybiczych przedstawiono w Tabeli 1.

Tabela 1. Leki przeciwgrzybicze - kolejność wprowadzania do lecznictwa [7,45,46]

Data wprowadzenia do lecznictwa	Nazwa leku przeciwgrzybiczego
1903	Jodek potasu
1907	Maść Whitifielda (kwas benzoowy i salicylowy na podłożu lanolinowo-wazelinowym)
1940	Kwas undecylenowy
1950	Nystatyna
1955	Natamycyna
1957	Flucytozyna
1958	Gryzeofulwina
1960	Amfoterycyna B
1962	Tolnaftat
1969	Klotrymazol
1969	Mikonazol
1974	Ekonazol
1976	Ketokonazol
1980	Itrakonazol
1981	Amorolfina
1982	Flukonazol
1988	Terbinafina

Następnymi przedstawicielami pierwszej generacji leków azolowych były: ekonazol, izokonazol, tiokonazol, butokonazol, bifonazol i oksykonazol (Ryc. 4).

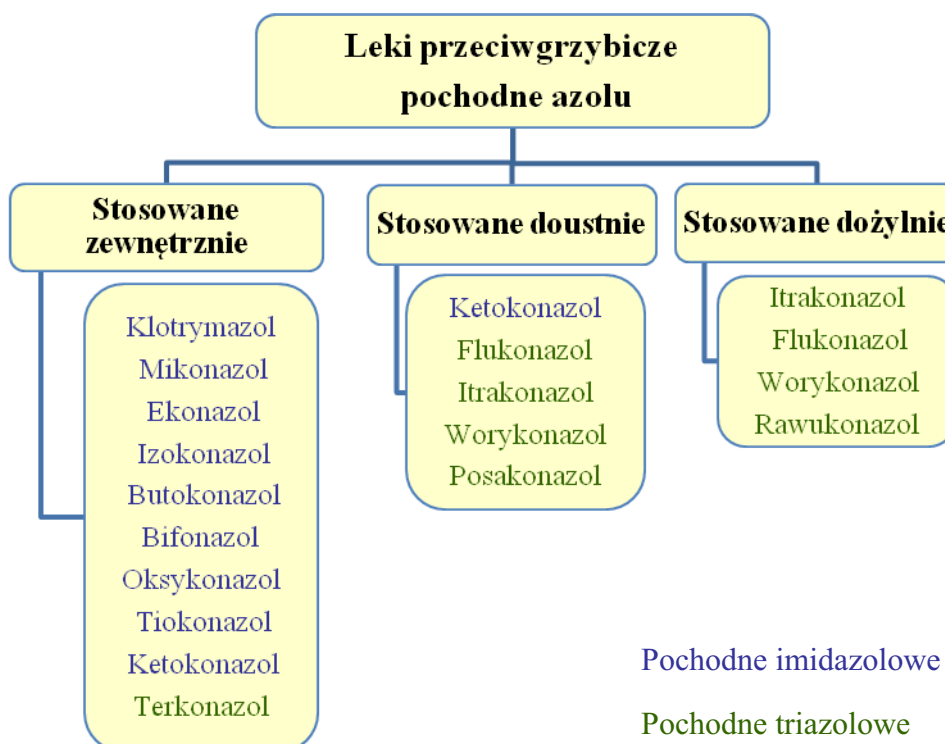


Ryc. 4. Struktury I generacji imidazoli przeciwgrzybiczych

Badania farmakokinetyczne w/w związków leczniczych przeprowadzone na myszach, szczurach i ludziach wykazały, że stymulują one aktywność enzymów wątroby, co prowadzi do szybkiego metabolizmu i inaktywacji. Dlatego też klotrymazol i mikonazol nie są skuteczne przy podawaniu doustnym [40,-42,46]. Ponieważ imidazole I generacji charakteryzują się wysoką aktywnością przeciwgrzybiczą, szczególnie w leczeniu infekcji miejscowych opracowano wiele postaci farmaceutycznych zawierających te substancje lecznicze, m. in. kremy, maści, szampony, pudry, tabletki dopochwowe, które są nadal szeroko stosowane zarówno w medycynie jak i weterynarii [47], a ich zaletą jest niewysoki koszt kuracji (generyki).

W 1979 roku wprowadzono na rynek farmaceutyczny parenteralną formę mikonazolu [48], czyli iniekcje Daktarin® I.V., zawierające azotan mikonazolu i niejonowy surfaktant Cremophor EL (polietoksyłowany olej rycynowy), umożliwiającą dożylną podanie związku nierozpuszczalnego w wodzie. Okazało się, że użyta substancja pomocnicza powoduje poważne działania niepożądane (reakcje anafilaktyczne) i z tego względu wycofano ten preparat z leczenia w 1997 roku. Jednak idea parenteralnej formy podania mikonazolu nie została porzucona badacze belgijscy opracowali kolejny preparat zawierający cyklodekstrynę i kwas mlekowy jako solubilizatory [17].

W 1981 dopuszczono do obrotu pochodną imidazolu zawierającą w swej budowie układ fenylopiperyminy. Był nią ketokonazol znany też pod nazwą Nizoral® (Janssen Pharmaceutica, Belgia). Przez wiele lat był lekiem pierwszego rzutu w terapii grzybic układowych i powierzchniowych, a jego szczególną zaletą była możliwość doustnego podania (Ryc. 5.), uznawana za najwygodniejszą przez pacjentów. Ketokonazol jest zaliczany do II generacji leków imidazolowych.

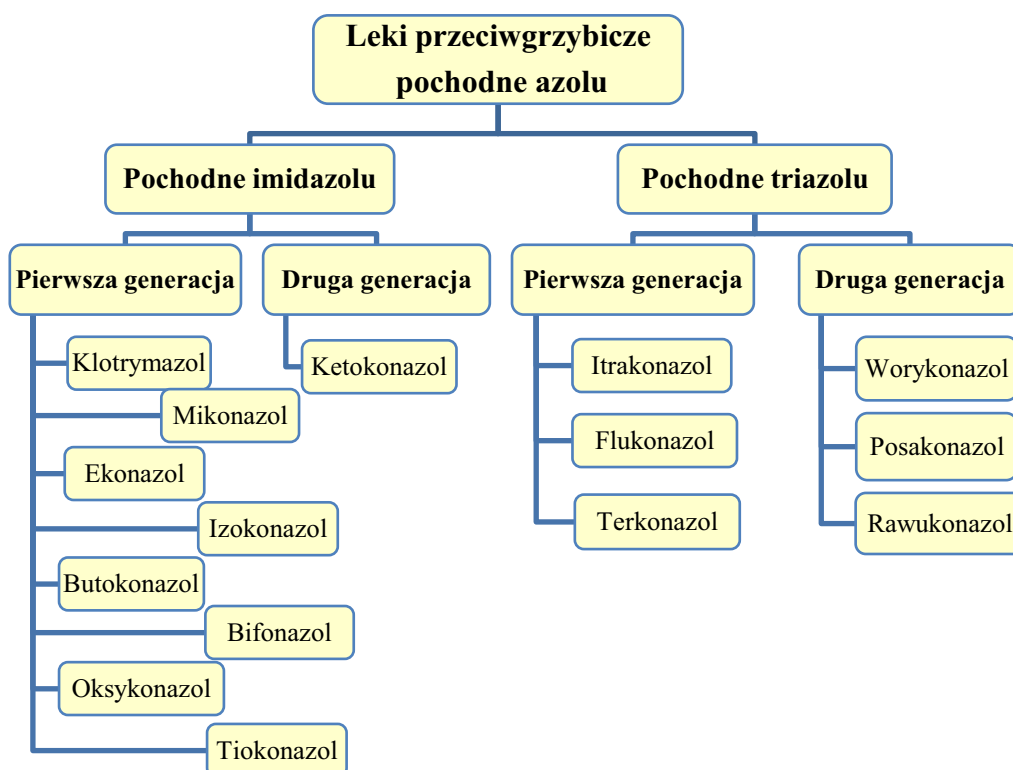


Ryc. 5. Podział pochodnych azolowych ze względu na drogę podania [8,15]

Chociaż obecnie miejsce ketokonazolu w terapii ciężkich grzybic systemowych zajęły nowsze leki azolowe, jest wciąż stosowany, a w leczeniu łupieżu jest nadal niekwestionowanym liderem. Szampony lecznicze dostępne bez recepty (OTC), w których składzie jest ketokonazol to wciąż najpopularniejsza metoda leczenia tego schorzenia. O jego popularności

może świadczyć szeroki wachlarz dostępnych szamponów z ketokonazolem na polskim rynku: Nizoral, NizaxMed, Noell, Nizopol, Zoxin, Zoxinat, Ketoxin i inne.

Następnym milowym krokiem w terapii grzybic była synteza pochodnych triazolowych. Są one nazywane azolami II lub III generacji (Ryc. 6.), w zależności czy autorzy uwzględniają podział tylko na imidazole i triazole, czy szczegółowiej w każdej z tych grup rozróżniają starsze i nowsze substancje lecznicze [40,44] .

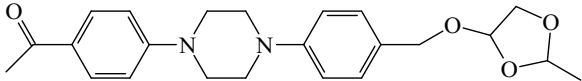
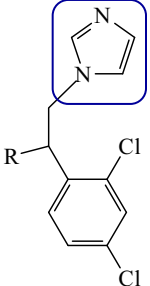
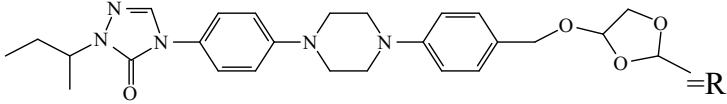
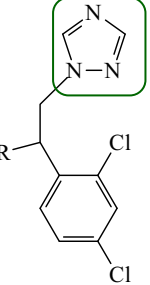
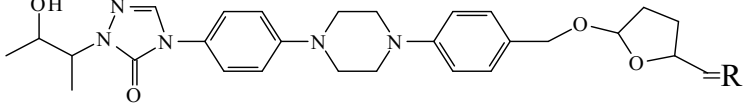
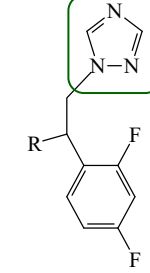
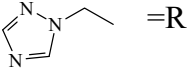
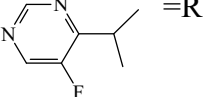
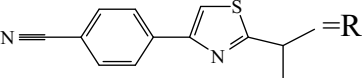
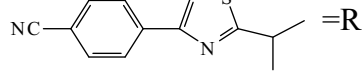
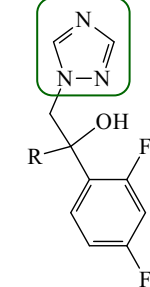
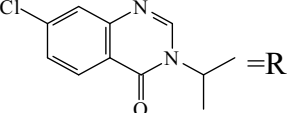


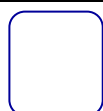
Ryc. 6. Podział leków przeciwgrzybiczych pochodnych azolu [40,44,45]

Po zastąpieniu pierścienia imidazolowego 1,2,4-triazolowym otrzymano szereg związków wykazujących kilkakrotnie silniejsze działanie przeciwgrzybicze od substancji macierzystej. Pierwszym lekiem z tej grupy był itrakonazol (Sporanox, Orungal, Triaxol), który jest zbliżony budową do ketokonazolu - Tabela 2.

Wprowadzona do lecznictwa w roku 1982 kolejna pochodna triazolu, flukonazol (Diflucan, Flumycon, Flukofast, Mycosyst) jest bardzo dobrze rozpuszczalna w wodzie, charakteryzuje się przez to wysoką biodostępnością i może być stosowana dożylnie, a przy tym ma bardzo szerokie spektrum działania antymikotycznego.

Tabela 2. Budowa pochodnych azolu II-IV generacji

Nazwa polska/ angielska	Struktura	
Ketokonazol/ Ketoconazole		
Itraconazol/ Itraconazol		
Posakonazol/ Posaconazole		
Fluconazol/ Fluconazole		
Worykonazol/ Voriconazole		
Isawukonazol/ Isavuconazole		
Rawukonazol/ Ravuconazole		
Albakonazol/ Albaconazole		



imidazol = 1,3-diazol



1,2,4-triazol

Najnowsza generacja leków przeciwgrzybiczych zawierających w swej cząsteczce układ triazolowy to: worykonazol, posakonazol, rawukonazol, isawukonazol, albakonazol (ich budowę przedstawiono w Tabeli 2.) charakteryzują się one bardzo szerokim spektrum działania [49,50] i powinny być używane bardzo rozważnie, w leczeniu ciężkich przypadków grzybic układowych (np. posocznic) nieodpowiadających na leczenie innymi środkami [17]. Chociaż pochodne azolu zdominowały rynek leków przeciwgrzybiczych nie można zapominać o pochodnych alliloaminy, pirydynonu czy morfoliny.

Do grupy pochodnych alliloaminy należy terbinafina i naftifina. Na rynku polskim naftifina jest dostępna jedynie w kremie Exoderil, terbinafina zaś występuje w wielu preparatach doustnych: tabletkach Lamisil, Terbisil, Erfin, TerbiGen oraz kremach, żelach i aerozoluach do stosowania miejscowego (Lamisilatt, Terbiderm, Onymax, Afugin) [7,12,51].

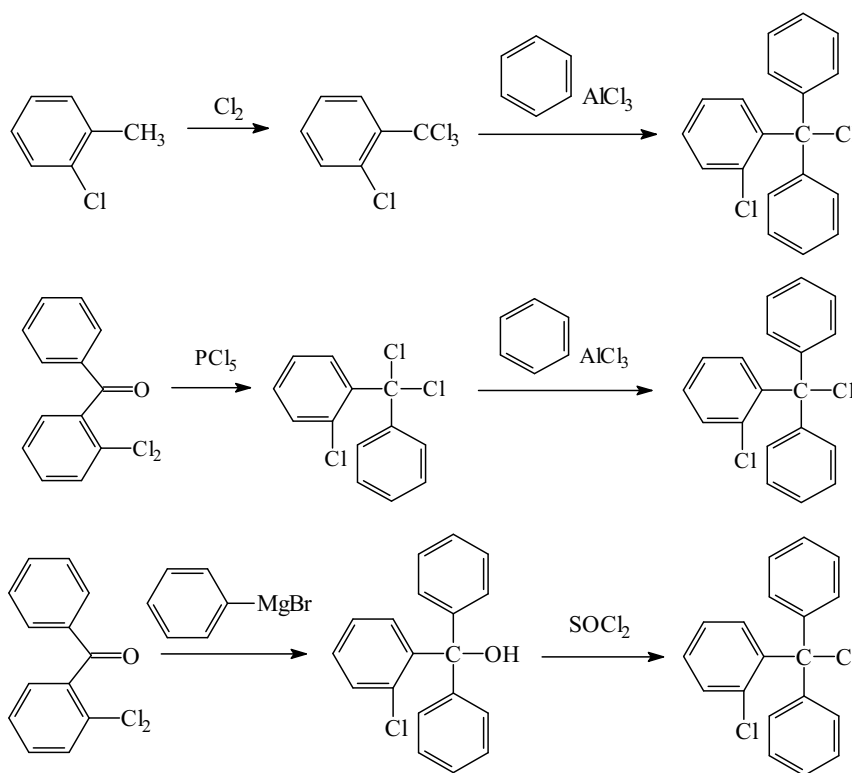
Mimo tej różnorodności leków przeciwgrzybiczych największe nadzieje pokładane są w grupie pochodnych azolu, są one bowiem lekami z wyboru w schematach leczenia najróżniejszych infekcji grzybiczych, w tym ciężkich przypadków grzybic u pacjentów z współistniejącymi poważnymi chorobami (w tym nowotworami i AIDS) [7,41,42]. Dlatego też wciąż trwają prace nad nowymi pochodnymi z tej grupy [52-57] oraz nowymi postaciami farmaceutycznymi znanych związków [17-19]. Pochodne azolu o działaniu przeciwgrzybiczym przez swą kilkudziesięcioletnią popularność mają dobrze poznaną farmakologię i farmakokinetykę oraz profil interakcji, przez co uważane są za leki bezpieczne.

3.2. Otrzymywanie badanych pochodnych azolu

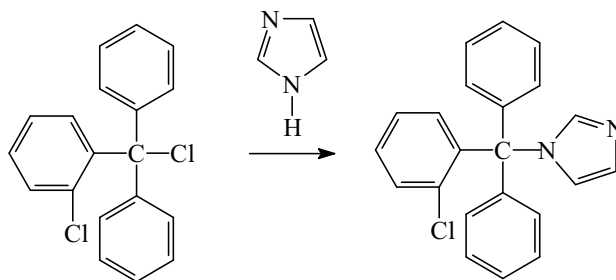
Cztery pochodne azolu o działaniu przeciwgrzybiczym: flukonazol, klotrymazol, ketokonazol i azotan mikonazolu nie są już chronione prawem patentowym, więc ich synteza jest dobrze poznana, a produkcja rozpowszechniona na całym świecie. Choć tematem rozprawy są zagadnienia związane z analizą leków, znajomość etapów syntezy jest ważna, ponieważ wykrywając zanieczyszczenia leku, możemy natrafić na niewielkie ilości związków chemicznych używanych w reakcjach syntezy tych leków.

Naukowcy z laboratoriów Bayer'a jako pierwsi zsyntetyzowali klotrymazol, trzy możliwe drogi syntezy przedstawiono na Ryc. 7.

I. Etap: synteza 2-chlorotrifenylochloroku

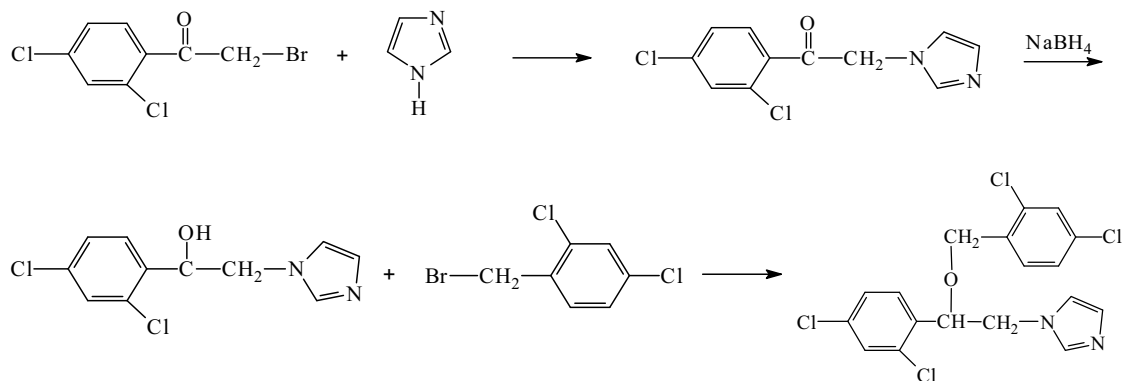


II. Etap: reakcja 2-chlorotrifenylochloroku z imidazolem w obecności trietyloaminy



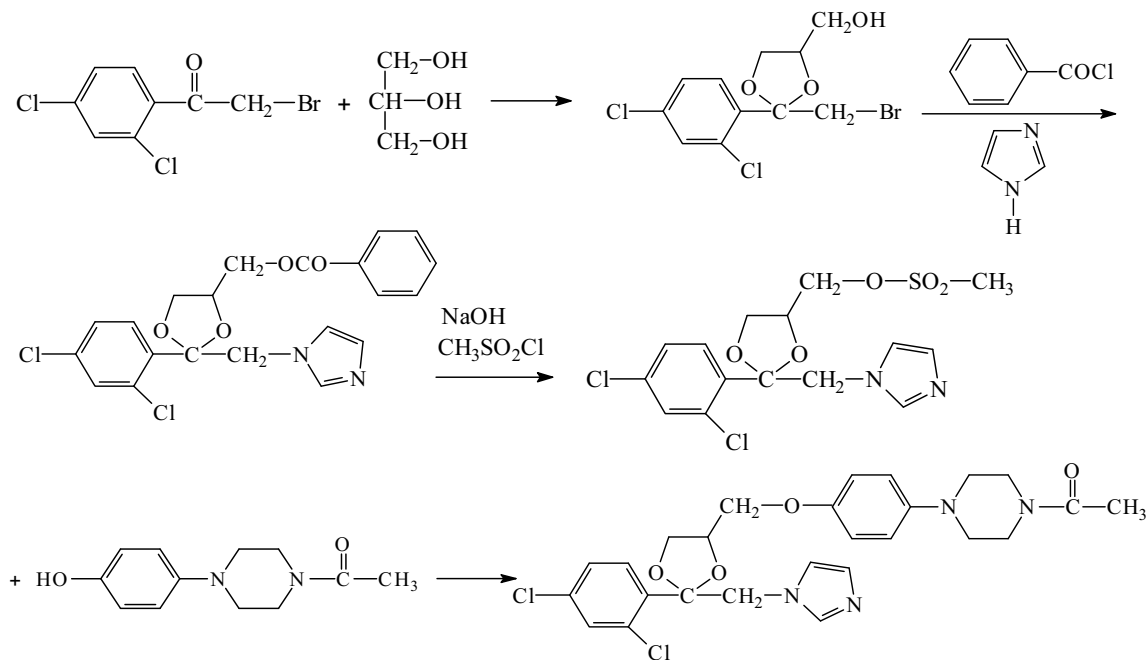
Ryc. 7. Synteza klotrymazolu [58]

W tym samym czasie w laboratoriach Janssen trwały prace nad opatentowaniem mikonazolu, który powstaje w wyniku reakcji przedstawionych na Ryc. 8. Substratami reakcji są bromek 2,4-dichlorofenacylu i imidazol. Powstający 1-(2,4-dichlorobenzylometylo)-imidazol jest następnie poddawany redukcji grupy karbonylowej do hydroksylowej, po czym następuje alkilacja tej grupy 2,4-dichlorobenzylometylobromkiem.



Ryc. 8. Synteza mikonazolu [58]

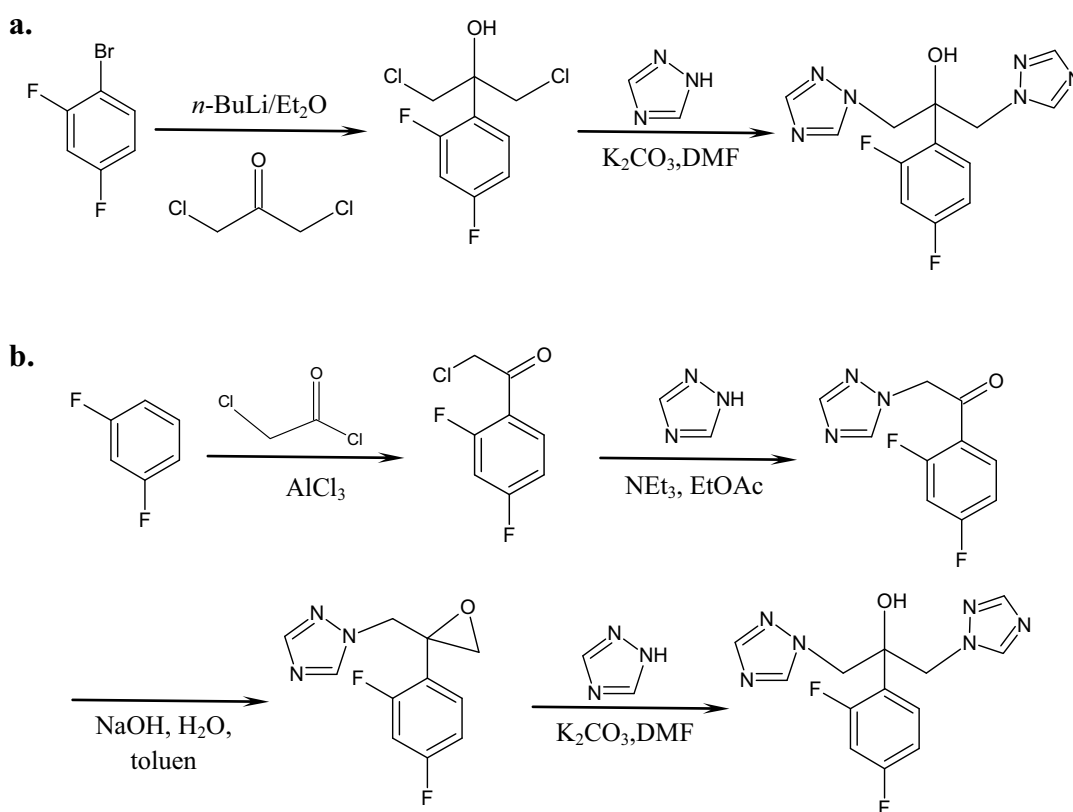
W tym samym konkretnie farmaceutycznym kilka lat później opracowano syntezę ketokonazolu - Ryc. 9.



Ryc. 9. Synteza ketokonazolu [58,59]

Substratami reakcji są bromek 2,4-dichlorofenacylu oraz glicerol. Utworzony produkt, *cis*-2-(2,4-dichlorofenilo)-2-bromoetylo-4-hydroksymetylo-1,3-dioksolan), poddawany jest reakcji acylacji grupy hydroksylowej oraz alkilacji tj. przyłączenia grupy imidazolowej. Następnie otrzymany związek poddawany jest hydrolizie zasadowej (NaOH) i reakcji z chlorkiem metanosulfonowym. W ostatnim etapie syntezy dochodzi do alkilacji, w której efekcie przyłączany jest człon hydroksyfenylopiperazynowy [58,59].

Naukowcy z Pfizer'a opracowali syntezę flukonazolu, która może przebiegać w dwojaki sposób – Ryc. 11. W pierwszym sposobie otrzymywania flukonazolu substratem jest 1-bromo-2,4-fluorobenzen (Ryc. 10 a.), a drugą możliwością jest katalizowana chloroacetylacja 1,3-difluorobenzenu (Ryc 10 b.) [60].

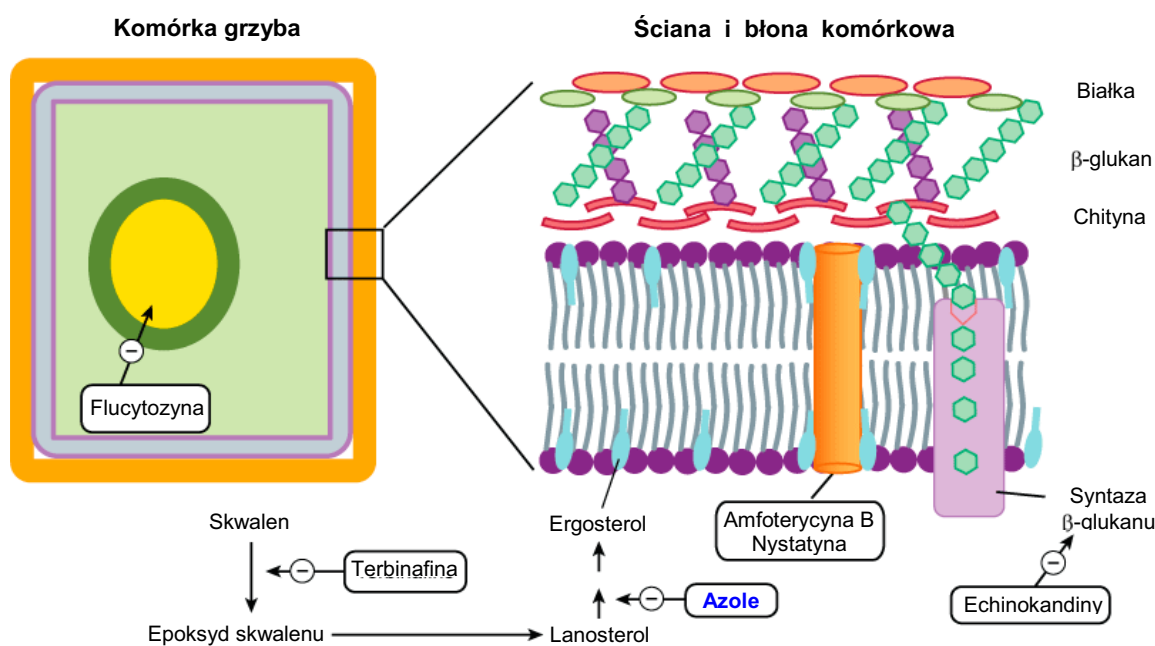


Ryc. 10 . Synteza flukonazolu [60]

3.3. Farmakologia pochodnych azolu

3.3.1. Mechanizm działania

Mechanizm działania przeciwgrzybiczego pochodnych azolu opiera się na zaburzeniu funkcji błony i ściany komórkowej grzybów poprzez zahamowanie izoenzymu 14- α -demetylasy cytochromu P-450 (Ryc. 12). Atom azotu z cząsteczki azolu wiąże się z żelazem hemu cytochromu P-450 hamując podczas komórkowej syntezy ergosterolu demetylację w położeniu 14 sterolu. W ten sposób ulega zmniejszeniu zawartość ergosterolu w błonie komórkowej grzyba oraz dochodzi do kumulacji toksycznego produktu pośredniego, który zawiera grupę metylową w położeniu 14. Następstwem są zaburzenia czynności błony komórkowej i zahamowanie wzrostu, wolniejsze namnażanie komórek grzybów, które tym samym stają się bardziej podatne na fagocytozę [45].



Ryc. 11. Mechanizm działania niektórych leków przeciwgrzybiczych [61]

Wadą azoli jest hamowanie aktywności innych enzymów cytochromu P-450, uczestniczących w syntezie hormonów w organizmie człowieka oraz biorących udział w metabolizmie wielu leków [43,44,61,62], np. przeciwdepresyjnych, statyn, doustnych preparatów antykoncepcyjnych. Niektóre przykłady zebrano w Tabeli 3.

Dodatkowy mechanizm działania grzybobójczego azoli uaktywnia się po podaniu dużych dawek niektórych pochodnych imidazolowych (np. klotrymazolu czy mikonazolu). Polega on na bezpośrednim działaniu fizjochemicznym na błonę komórkową, wywołującym reakcję

pomiędzy substancją leczniczą i nienasyconymi kwasami tłuszczowymi wchodzącymi w skład błony komórkowej [44].

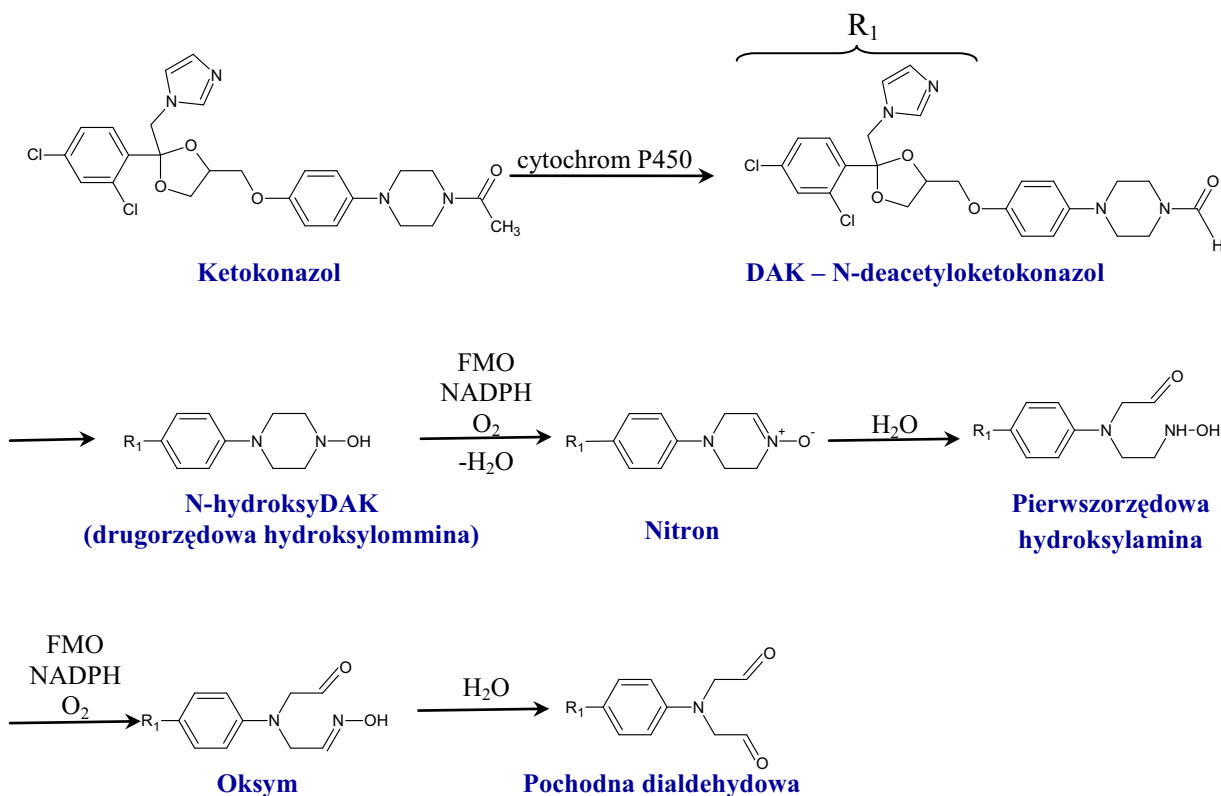
Tabela 3. Przykłady potencjalnych interakcji ketokonazolu i itrakonazolu [61]

Związek chemiczny	Działanie	Potencjalna interakcja
Przeciwwskazane ze względu na poważne działania niepożądane		
Alprazolam	przeciwłękowe	przedłużone uspokojenie
Astemizol	przeciwalergiczne	kardiotoksyczność
Lowastatyna	obniżające poziom lipidów we krwi	miopatia, rabdomioliza
Midazolam	nasenny	przedłużone uspokojenie
Simwastatyna	obniżające poziom lipidów we krwi	miopatia, rabdomioliza
Terfendyna	przeciwalergiczne	kardiotoksyczność
Triazolam	uspakajające, nasenne	przedłużone uspokojenie
Jednoczesne stosowanie niewskazane		
Cymetydyna	hamowanie wydzielanie kwasu solnego w żołądku	nieskuteczność leczenia przeciwgrzybiczego
Izoniazyd	przeciwgruźlicze	
Fenobarbital	nasenne, uspakajające	
Fenytoina	przeciwwarytmiczne	wzrost poziomu fentyoiny lub nieskuteczność przeciwgrzybicza
Lansoprazol	hamowanie wydzielanie kwasu solnego w żołądku	nieskuteczność leczenia przeciwgrzybiczego
Omeprazol		
Ranitydyna		
Rifampicyna	przeciwgruźlicze	
Należy zachować ostrożność przy jednoczesnym stosowaniu		
Amfoterycyna B	przeciwgrzybicze	farmakologiczny antagonizm
Amlodypina	przeciwnadciśnieniowe	powstawanie obrzęków
Karbamazepina	przeciwdrgawkowe, stabilizujące nastrój	obniżenie działania przegrzybiczego
Chlordiazepoksyd	przeciwłękowe, uspakajające	depresja CUN
Kortykosteroidy	przeciwzapalne, przeciwalergiczne, immunosupresyjne	wzrost działania kortykosteroidów
Cyklosporyna	imunoaupresyjne	nefrotoksyczność
Digoksyna	nasercowe	wzrost toksyczności
Etanol	leczenie zatruc metanolem	reakcja disulfiramowa
Fluoksetyna	przeciwdepresyjne	anoreksja
Loratadyna	przeciwalergiczne	wzrost poziomu loratadyny
Doustne leki przeciwzakrzepowe	przeciwzakrzepowe	wzmocniony efekt przeciwzakrzepowy
Doustne leki przeciwcukrzycowe	przeciwcukrzycowe	hipoglikemia
Chinidyna	przeciwwarytmiczne	ototoksyczność
Winkrystyna	cytostatyczne	nefrotoksyczność

3.3.2. Metabolizm

Znajomość metabolizmu i dróg eliminacji leku z organizmu jest ważna dla bezpieczeństwa terapii pacjenta. Z punktu widzenia analizy leku, który został poddany działaniu czynnika destrukcyjnego (np. promieniowania jonizującego), należy poznać strukturę metabolitów, gdyż często rozkład leku w różnych warunkach *in vitro* może prowadzić do tych samych czy podobnych produktów, co rozkład enzymatyczny *in vivo*.

Ketokonazol po podaniu doustnym jest wchłaniany w części żołądkowo-jelitowej, a jego absorpcja z przewodu pokarmowego wzrasta wraz ze spadkiem pH żołądka. Lek w ponad 90% wiąże się z białkami osocza (głównie albuminami), a następnie jest wydalany z żółcią do jelit. Tylko około 13% dawki wydalana jest z moczem, z czego 2-4% w postaci niezmienionej [63-66]. Metabolizowany jest przez mikrosomalne enzymy wątrobowe związane z cytochromem P-450, na drodze oksydacji, odłączenia imidazolowego i piperazynowego pierścienia, oksydatywną *O*-dealkilację i aromatyczną hydroksylację - Ryc. 12.

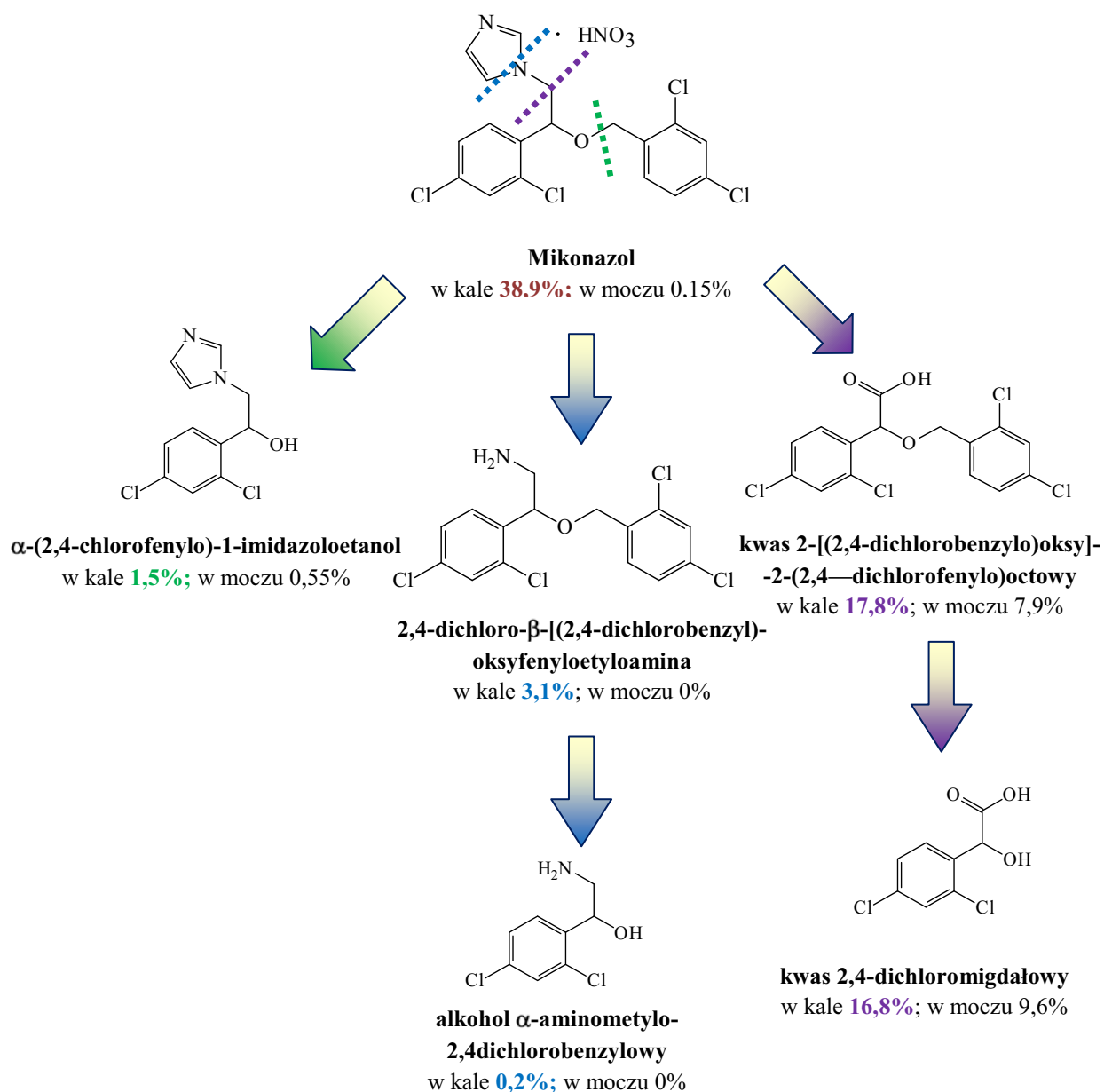


Ryc. 12. Metabolizm ketokonazolu [63,64]

Głównym metabolitem ketokonazolu jest N-deacetylowa pochodna (N-deacetyloketokonazol) oznaczana symbolem DAK (Ryc. 12.). W drugim etapie metabolizmu powstaje z niej pochodna N-hydrokso-DAK, która jest metabolizowana dalej przez monooksygenazę flawinową (FMO) do wielu dalszych produktów Ryc. 10. Eliminacja ketokonazolu z osocza jest dwufazowa, a okres półtrwania wynosi 2 h podczas pierwszych 10 h oraz 8 h w okresie późniejszym. Istnieje hipoteza, że za hepatotoksyczność ketokonazolu najbardziej odpowiedzialna jest metabolit zawierający ugrupowanie dialdehydowe [63].

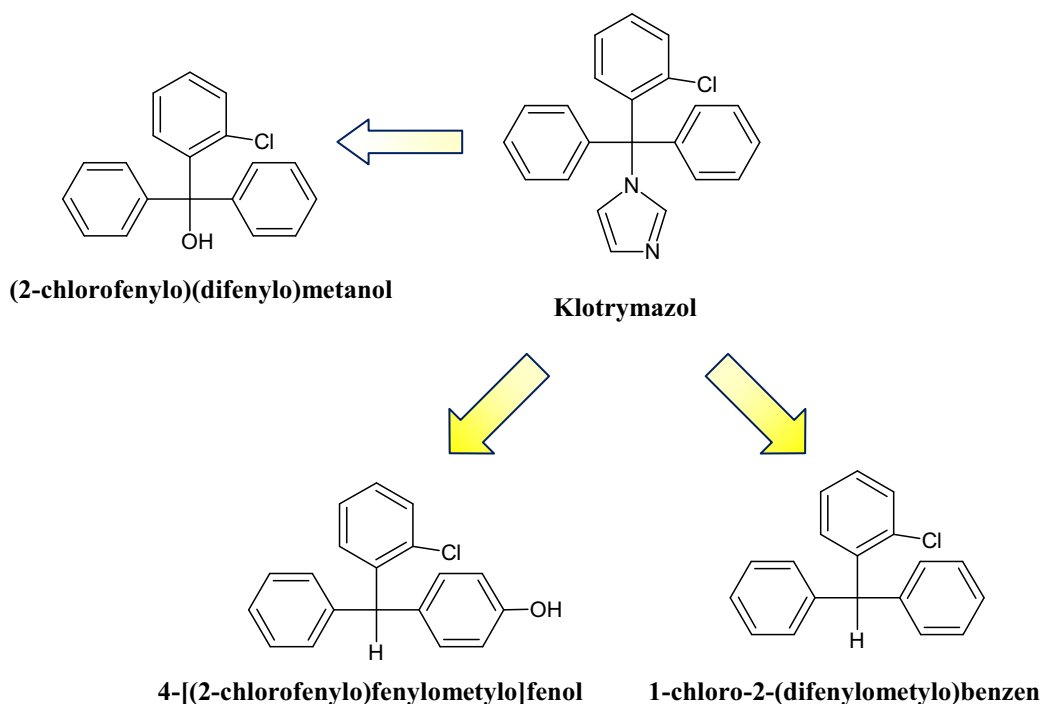
Flukonazol, drugi z doustnie stosowanych pochodnych azolu, jest lekiem charakteryzującym się bardzo dobrą biodostępnością, wchłania się z przewodu pokarmowego w ponad 90%, okres półtrwania wynosi około 30 godzin. Lek bardzo dobrze przenika do wszystkich badanych płynów w organizmie. Stężenie w ślinie jest porównywalne jak w osoczu, a w płynie mózgowo-rdzeniowym stanowi aż 80% tej wartości. Flukonazol jest wydalany głównie przez nerki, w postaci niezmienionej wydalane jest 80% dawki [63]. Wyodrębniono także dwa metabolity flukonazolu: glukuronian flukonazolu stanowiący 6,5% dawki oraz N-tlenek flukonazolu 2,0% dawki.

Obecnie mikonazol jest stosowany tylko jako lek zewnętrzny, lecz jego metabolizm jest dobrze poznany. Wchłanianie ogólnoustrojowe mikonazolu z kremów, zasypek i globulek jest ograniczone, poniżej 1% dawki. Wchłonięty mikonazol wiąże się z białkami osocza (88,2%) i krwinkami czerwonymi (10,6%), wydalana się z kałem (w niewielkiej ilości z moczem) w postaci wolnej i metabolitów [63,65]. Metabolity powstają w wyniku reakcji *O*-dealkilacji oraz oksydatywnej *N*-dealkilacji, a ich ilość (względem przyjętej dawki leki) przedstawiono na Ryc. 13.



Ryc. 13. Metabolizm mikonazolu [65]

Klotrymazol tak jak mikonazol jest lekiem stosowanym jedynie miejscowo, jego wchłanianie ze skóry jest niewielkie, ze śluzówki pochwy wynosi 3-10%. Tak jak pozostałe pochodne azolu metabolizowany jest w wątrobie do nieaktywnych metabolitów i wydalany z moczem i kałem [62]. Jego dwa główne metabolity to: 4-[(2-chlorofenylo)fenylometylo]fenol i 1-chloro-2-(difenylo)metylo)benzen, trzecim związkiem powstającym w najmniejszej ilości jest (2-chlorofenylo)(difenylo)metanol, ich struktury przedstawiono na Ryc. 14.



Ryc. 14. Metabolizm klotrymazolu [66]

3.4. Metody analityczne i badania trwałości pochodnych azolu – przegląd piśmiennictwa

Pochodne azolu o działaniu przeciwgrzybiczym są cenioną grupą leków, szeroko stosowaną i wciąż się rozwijającą, dlatego też przegląd piśmiennictwa został ograniczony do publikacji opisujących badania czterech wybranych pochodnych azolu: flukonazolu, klotrymazolu, ketokonazolu i azotanu mikonazolu. Od końca lat sześćdziesiątych XX wieku, gdy wprowadzono do leczenia pierwsze leki z tej grupy do dnia dzisiejszego powstało wiele publikacji na ich temat. Poza pracami typowo farmakologicznymi i klinicznymi przedstawiającymi ich działanie *in vitro* i *in vivo* powstało wiele prac oryginalnych dotyczących analitycznych metod ich badania.

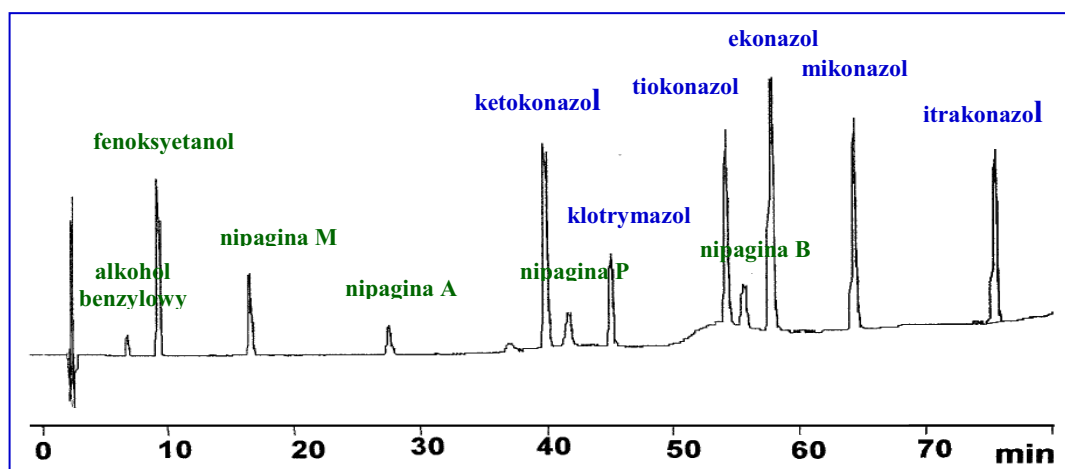
Przeważająca większość tych publikacji zawiera opis oznaczania zawartości pochodnych azolu w różnych matrycach takich jak: płyny ustrojowe i wydzieliny ludzi oraz zwierząt. Prace te mają istotne znaczenie dla monitorowania przebiegu terapii (mono- i polipragmazja) oraz badań klinicznych.

Kolejną grupą artykułów skupiających się na metodach ilościowej analizy są prace dotyczące kontroli jakości leków. Autorzy tych publikacji proponują szeroki wachlarz metod do określania zawartości leków przeciwgrzybiczych w najróżniejszych postaciach leku takich jak: kapsułki, tabletki (doustne i dopochwowe), syropy, zawiesiny, kremy, maści, roztwory do podania dożylnego, krople oczne, szampony, pudry i inne. Niekiedy badacze podejmują temat oznaczania kilku składników obok siebie lub zajmują się problemem trwałości leku. Pojawiają się także doniesienia opisujące właściwości fizyko-chemiczne tych związków (np. tworzenie kompleksów, solwatów, polimorfizm) czy właściwości spektralne.

W ostatnim dwudziestoleciu najpopularniejszymi metodami wykorzystywanymi w analizie leków są **metody chromatograficzne**, głównie **wysokosprawna chromatografia cieczowa – HPLC**. W przypadku badań polegających na rozdzieleniu i oznaczeniu substancji przeciwgrzybiczych pochodnych azolu również metoda HPLC dominuje [65,67-79]. Zarówno w badaniach przedklinicznych, gdzie *in vitro* i *in vivo* potwierdzana jest skuteczność działania środków leczniczych na organizm zwierząt [65,67,68], jak i jest niezwykle przydatną metodą oznaczania w badaniach klinicznych 0-IV etapu [69-71]. W wielu przypadkach autorzy publikacji dotyczących oznaczania związków azolowych związani są ze szpitalami klinicznymi [72-81], gdzie dokładna, czuła i szybka metoda oznaczania substancji leczniczej we krwi, surowicy czy ślinie ma niebagatelne znaczenie w optymalizacji terapii

pacjentów. Przykładem takich doniesień są prace badaczy francuskich związanych z ośrodkami szpitalnymi leczącymi pacjentów chorych na grzybicę przy współistniejących chorobach nerek [71,72] lub naukowców holenderskich monitorujących terapię przeciwgrzybiczą pacjentów będących nosicielami wirusa HIV [73]. Niejednokrotnie flukonazol jako lek dobrze pokonujący barierę krew-mózg dla celów terapeutycznych oznaczany jest także w płynie mózgowo-rdzeniowym [74,75], a miejscowo działający klotrymazol i mikonazol oznaczano w skórze [76] oraz wydzielinie z pochwy [77]. Wielu badaczy opublikowało metody oznaczania pochodnych azolowych w obecności innych leków w matrycy, dotyczy to leków z tej samej grupy chemicznej [78,79] czy terapeutycznej [80] jak też zupełnie innych środków podawanych pacjentom np. diazepamu czy fentanylu [81-83].

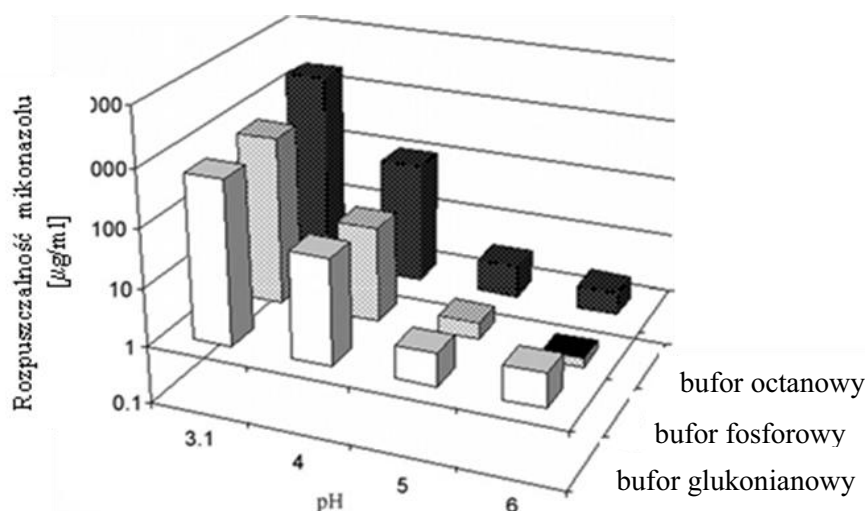
Inną grupą publikacji zawierającą opisy oznaczania ilościowego związków azolowych metodą HPLC jest poświęcona zagadnieniu jakości i technologii postaci leku [84-94]. Egipscy badacze w swej publikacji zaproponowali i porównali dwie metody chromatograficzne oznaczania klotrymazolu, ketokonazolu i flukonazolu *in substantia* oraz w typowych postaciach leku tj. w kremach, tabletkach doustnych i dopochwowych, kapsułkach i płynach infuzyjnych [84], podobną tematyką zajął się zespół Low-Wangboonskul, który opracował metodę HPLC do oznaczania ketokonazolu w tabletkach, kremie i szamponie [85]. Natomiast w artykule włoskich badaczy [86] przedstawiono metodę oznaczania sześciu związków azolowych (ketokonazolu, klotrymazolu, tiokonazolu, ekonazolu, mikonazolu i itrakonazolu) w szamponach przeciwgrzybiczych w obecności wielu konserwantów: alkoholu benzyłowego, fenoksyetanolu oraz estrów kwasu parahydroksybenzoesowego, takich jak ester: metylowy, etylowy, n-propylowy i n-butyłowy, - Ryc. 15.



Ryc. 15. Chromatogram HPLC wzorców oznaczanych azoli i konserwantów [86]

W kolejnej pracy autorstwa Stanisław i Zając, opracowano i zwalidowano metody oznaczania mikonazolu, ekonazolu, itrakonazolu (w postaci azotanów) oraz klotrymazolu i ketokonazolu w różnych postaciach leku [87].

Wysokosprawną chromatografię cieczą jest także metodą przydatną w badaniach dostępności farmaceutycznej [56,57,88]. Projektując nowe postaci leku ważny jest dobór substancji pomocniczych, więc prowadzone były także badania [89] określające rozpuszczalność związku przeciwgrzybiczego w zależności od doboru rozpuszczalnika i jego pH Ryc. 16.



Ryc. 16. Rozpuszczalność mikonazolu w zależności od pH i składu buforu [89]

Ponadto metoda HPLC była narzędziem oceny trwałości leków *in substantia* oraz w różnych postaciach leku np. tabletkach, kremach [89,90], aerozolu [91], roztworach [92-95].

W badaniach pochodnych azolu o działaniu przeciwgrzybiczym wykorzystywano także inne metody chromatograficzne np. chromatografię gazową [96-98] oraz cienkowarstwową [84,100-103].

Chromatografia gazowa jest metodą dużo rzadziej stosowaną w badaniach tej grupy leków. W ludzkim osoczu oznaczano tym sposobem mikonazol [96] oraz flukonazol (w tym przypadku lek był również oznaczany w moczu pacjentów) [97]. Brammer i Coates opisali badania kliniczne polegające na monitorowaniu dawki flukonazolu podawanego dożylnie lub doustnie 113 pacjentom z oddziałów neonatologii i pediatrii. W badaniach uczestniczyło 8 amerykańskich szpitali oraz po jednym z Finlandii, Francji i Wielkiej Brytanii. Do oznaczeń ilościowych w Europie wykorzystywano chromatografię gazową (detekcja MS), a w Stanach Zjednoczonych chromatografię cieczą (detektor UV) [98].

Chromatograf gazowy ze spektrometrem mas był także narzędziem wykorzystywanym do oznaczania klotrymazolu jako zanieczyszczenia wykrywanego w wodach powierzchniowych [99].

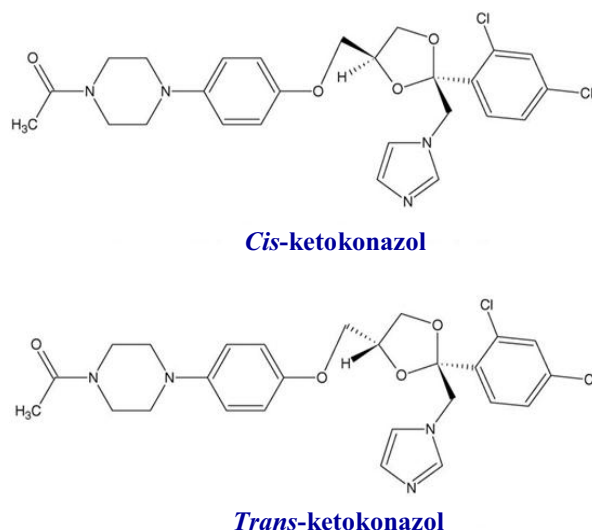
Metoda **chromatografii cienkowarstwowej** była używana do rozdziłu, identyfikacji i oznaczania ilościowego (w przypadku zastosowania densytometrii) kilku substancji leczniczych z tej samej grupy i ich zanieczyszczeń w różnych postaciach leku np. klotrymazolu, ketokonazolu i flukonazolu [84], lub klotrymazolu, ketokonazolu i mikonazolu [100] w obu przypadkach zastosowano metodę referencyjną (HPLC). Podobną tematyką zajmował się zespół z Collegium Medicum UJ w Krakowie i zwalidował metodę densytometrycznego oznaczania bifonazolu, flukonazolu i itrakonazolu [101]. Oprócz oznaczania obok siebie pochodnych azolu metodę TLC stosowano również do oznaczania klotrymazolu w obecności metronidazolu [102] i tynidazolu [103],

Coraz częściej stosowaną metodą stosowaną w celu rozdziłu kilku związków i ich oznaczenia ilościowego jest **elektroforeza kapilarna** [104-106]. Podobnie jak metoda HPLC elektroforeza kapilarna (CE) jest stosowana do oznaczania stężenia pochodnych azolu w płynach ustrojowych i jest wykorzystywana w badaniach klinicznych i przedklinicznych. Na przykład zespół naukowców z Würzburga poleca metodę CE do oznaczania zawartości klotrymazolu w osoczu myszy [104].

Badacze z uniwersytetu w Madrycie (współpracujący z madryckim oddziałem firmy GlaxoWellcome) opracowali walidację metody elektroforetycznego rozdziłu i oznaczania obok siebie klotrymazolu, flukonazolu, ketokonazolu, itrakonazolu, worikonazolu, imidazolu, terbinafiny oraz werapamilu [105]. Przedstawiona metoda charakteryzowała się się dobrymi parametrami statystycznymi, a jej granica wykrywalności (LOD) wynosiła 0,12-0,90 µg/ml, natomiast granica oznaczalności (LOQ) 0,62-3,00 µg/ml. Najlepsze parametry uzyskano dla oznaczania klotrymazolu. Ta sama grupa naukowców z powodzeniem zastosowała tę metodę do oznaczania azoli w tkankach ludzkich (wątrobie) [106].

Metoda kapilarnej elektroforezy wraz z detekcją UV i MS jest także polecana do rozdziłu izomerów ketokonazolu (*cis* i *trans* – Ryc. 17.), do separacji stosowany był bufor mrówczanowy z dodatkiem cyklodekstryny [107].

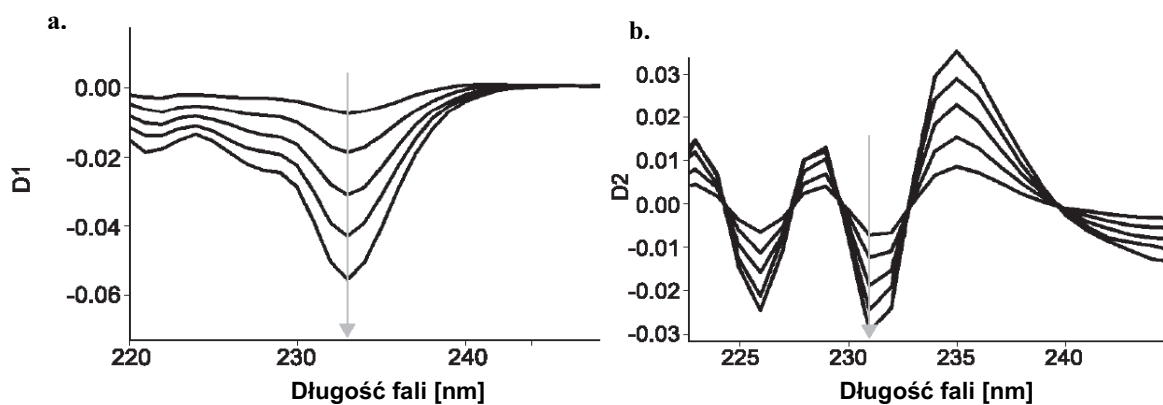
Elektroforeza jest także wykorzystywana do analizy ilościowej ketokonazolu w różnych postaciach leku, opracowana przez naukowców z Belgradu metoda charakteryzowała się dobrymi parametrami statystycznymi, była bardziej selektywna niż polecana przez farmakopeę europejską metoda HPLC, lecz czułość proponowanej przez nich metody była nieco niższa niż metody referencyjnej [107].



Ryc. 17. Struktury izomerów ketokonazolu [107]

Kolejna grupa metod analitycznych używanych w badaniach pochodnych azolu to metody spektroskopowe. Najczęściej polecaną metodę z tej grupy jest **spektrofotometria w nadfiolecie**. Jest to metoda szybka i prosta, lecz jej ograniczeniem jest niska selektywność, który to problem próbuje się ominąć stosując spektrofotometrię pochodnych.

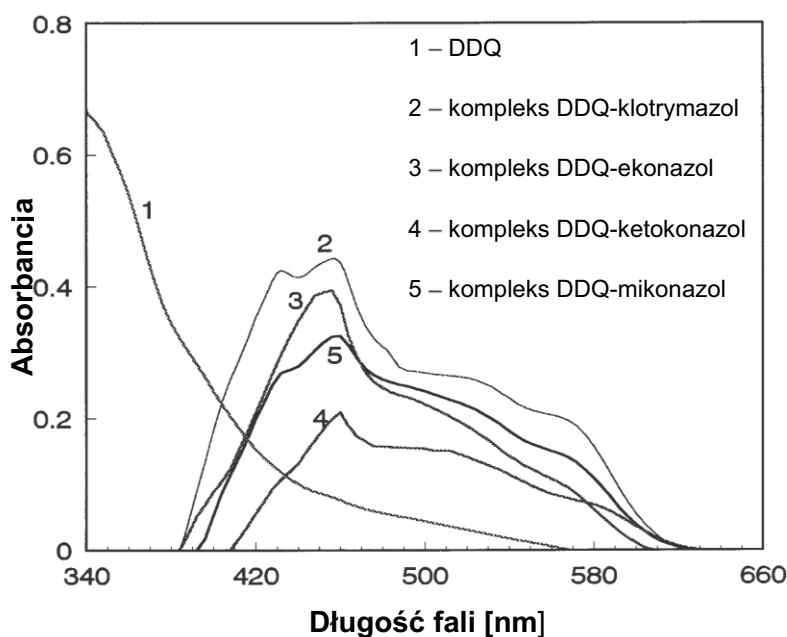
Metodę UV oznaczania siedmiu pochodnych azolu przy użyciu pierwszej lub drugiej pochodnej widma UV opublikowali w ubiegłym roku Ekiert i Krzek [108]. Na rycinie przedstawiono niektóre analityczne maksima wybrane do oznaczeń – Ryc. 18.



Ryc. 18. Pierwsza pochodna widma UV azotanu mikonazolu (a) oraz druga pochodna widma UV ketokonazolu (b), rozpuszczalnik metanol [108]

Wykorzystując pochodne widm UV oznaczono też flukonazol w kapsułkach, roztworach dożylnych i syropie [109,110], ketokonazol w emulsjach [111] mikonazol w kremie [112] oraz mikonazol w obecności metronidazolu w globulkach [113].

Opublikowano także kilka prac dotyczących oznaczania związków azolowych za pomocą spektrofotometrii w zakresie widzialnym po uprzednim przeprowadzeniu związków w barwne kompleksy [114-116]. Badacze z Egiptu zaproponowali metodę oznaczania pochodnych azolu w barwnych kompleksach z 2,3-dichloro-5,6-dicyjanochinonem (DDQ) oraz metodę **spektrofluorymetrycznego** oznaczania ketokonazolu wykorzystując jego naturalną fluorescencję przy długości fali 375 nm [116]. Charakterystyczne maksima absorpcji kompleksów DDQ z pochodnymi azolu proponowane do oznaczeń ilościowych przedstawia Ryc. 19.



Ryc. 19. Widma absorpcji kompleksów DDQ z pochodnymi azolu (rozpuszczalnik metanol) [116]

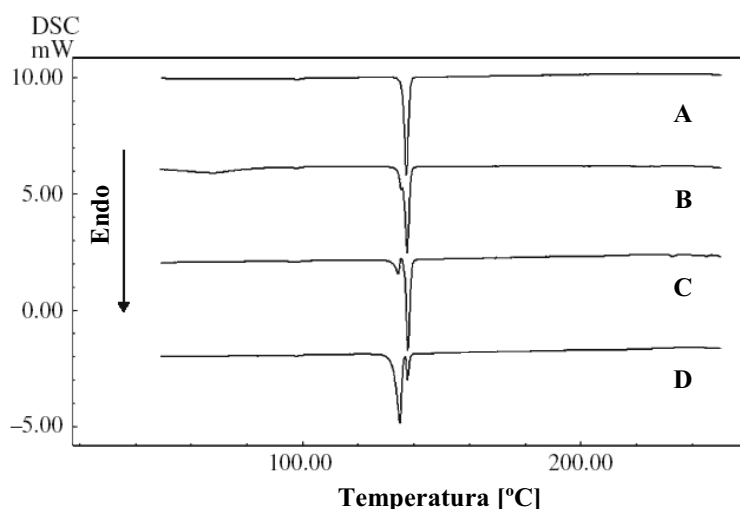
Oznaczanie fluorymetryczne wykorzystano także w badaniach dotyczących reakcji łączenia się ketokonazolu z albuminami ludzkiej i wołowej surowicy [117]. Badacze chińscy wyznaczyli tą metodą parametry termodynamiczne reakcji syntezy kompleksów oraz wyjaśnili mechanizm tych interakcji.

Metodę **magnetycznego rezonansu jądrowego** stosuje się zwykle w badaniach tożsamości związków, aby poznać dokładną strukturę i ułożenie przestrzenne atomów w cząsteczce [118]. Analiza porównawcza ^1H i ^{13}C -NMR flukonazolu i itrakonazolu pozwoliła naukowcom z Würzburga określić jak zachodzi protonizacja tych związków w środowisku kwasowym [119]. Wykazano, że w itrakonazolu najpierw przyłącza się proton do pierścienia piperazynowego (N26), natomiast w drugiej kolejności następuje addycja protonu do azotu w pierścieniu triazolowym (N11) – Tabela 2.

Rzadziej opisywane jest zastosowanie metod **elektroanalitycznych** w analizie leków, jednakże w dostępnym piśmiennictwie znaleziono przykład zastosowania woltamperometrii w analizie ilościowej ketokonazolu [120] oraz **polarografii** do oznaczania klotrymazolu [121] i ketokonazolu [120].

W analizie leków pochodnych azolu należy wspomnieć także o metodach **termoanalitycznych i kalorymetrycznych**, są one nieocenionym narzędziem głównie dla technologów postaci leku. Na podstawie krzywych DSC można określić interakcje między związkiem aktywnym, a substancją pomocniczą w projektowanej postaci leku. Przykładem takich prac mogą być badania dotyczące flukonazolu i laktozy [122] oraz mikonazolu i ketokonazolu w kompleksach z cyklodekstrynami [123-125].

Metodą **skaningowej kalorymetrii różnicowej (DSC)** oraz **termogravimetrii (TG)** można także badać procesy zachodzące podczas ogrzewania i chłodzenia próbek substancji leczniczych, ich formy polimorficzne tworzące się podczas krystalizacji z różnych rozpuszczalników (Ryc. 20.), lub podczas ogrzewania [126,127]. W tego typu badaniach form krystalicznych wykorzystywane są także metody spektrofotometrii w podczerwieni (FT-IR, Raman) oraz rentgenograficzne (XRD).



Ryc. 20. Krzywe DSC flukonazolu: A-związek wyjściowy, B-rekrytalizacja z metanolu, C-rekrytalizacja z acetonu, D-rekrytalizacja z chloroformu [127]

Metody **mikrobiologiczne** zwykle są stosowane w celu udowodnienia skuteczności przeciwbakteryjnej czy przeciwgrzybiczej związku leczniczego [128,129], lecz także istnieje możliwość oznaczania tym sposobem zawartości związku aktywnego w postaciach leku. Naukowcy z Brazylii zaproponowali taką metodę oznaczania ilościowego ketokonazolu w szamponach [130].

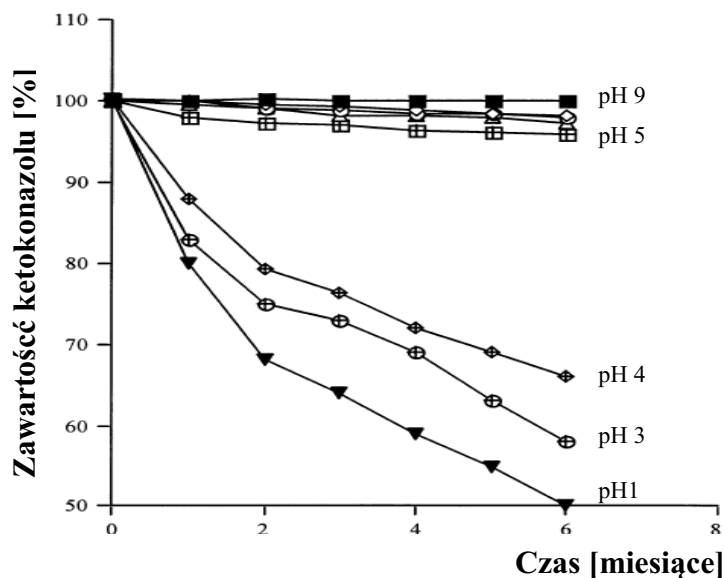
Dla bezpieczeństwa terapii bardzo ważnym zagadnieniem jest **trwałość leku**, ponieważ rozkład substancji leczniczej może prowadzić do:

- obniżenia dawki leku, czyli obniżenia lub zaniku działania terapeutycznego,
- reakcji alergicznej lub zatrucia produktami degradacji,
- dyskwalifikacji leku z uwagi na nieodpowiedni kolor, konsystencję, zapach czy smak [130].

W dostępnej literaturze znaleziono doniesienia o trwałości pochodnych azolu poddanych wpływowi temperatury, czynników hydrolitycznych oraz światła. Większość publikacji skupia się na oznaczeniu ubytku substancji leczniczej poddanej działaniu określonego czynnika destrukcyjnego [84,89-93,130-135], tylko niektórzy badacze wykryli, wyizolowali i zidentyfikowali produkty degradacji tych związków [72,79-81].

Najwięcej publikacji z tej dziedziny dotyczy **trwałości termicznej** pochodnych azolu w roztworach, prace te mają charakter aplikacyjny, a ich celem była odpowiedź na pytanie jak długo mogą być wykorzystywane roztwory pochodnych azolu w danych warunkach przechowywania [89-93]. Bardziej złożone badania nad trwałością ketokonazolu w roztworach wodnych o różnym pH prowadził zespół naukowców francuskich [95].

Określili oni wpływ stężenia ketokonazolu, zawartości antyoksydanta (butylowanego hydroksytoluenu - BTH), solubilizatora (karbopolu), na rozkład związku, a także ocenili wpływ pH (Ryc. 21.) i temperatury na trwałość ketokonazolu.



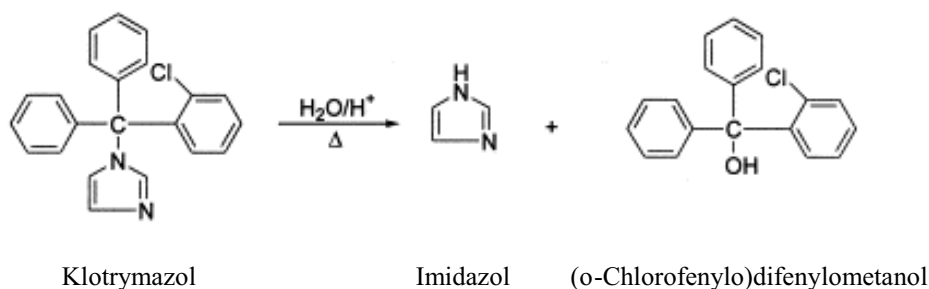
Ryc. 21. Trwałość ketokonazolu w roztworach wodnych: wpływ pH [95]

W swoich badaniach posługiwali się metodą HPLC oraz pomiarami lepkości. Ustalili, iż **hydroliza** ketokonazolu zachodzi według reakcji pseudo pierwszego rzędu słabiej

w zasadowym środowisku, a bardziej radykalnie w środowisku kwasowym. Optymalne warunki przechowywania to pH 7 i zawartość (BHT) na poziomie 0,1%.

Zespół naukowców z Egiptu przeprowadził kompleksową ocenę trwałości termicznej i hydrolitycznej flukonazolu, ketokonazolu i klotrymazolu *in substantia* i w typowych postaciach leków.

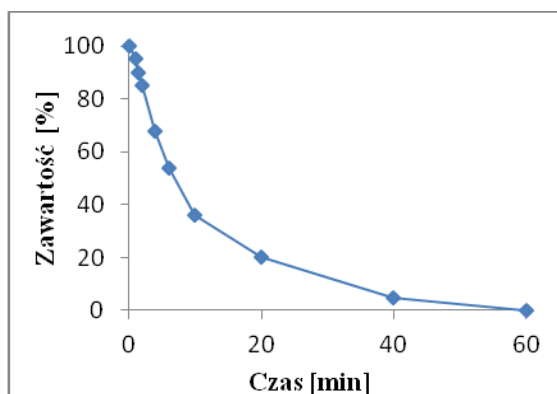
Tylko wśród tych pochodnych azolu jedynie klotrymazol pod wpływem kwasu solnego (w podwyższonej temperaturze i pod ciśnieniem) uległ rozkładowi do (o-chlorofenylo)difenyloetanolu i imidazolu – Ryc. 22.:



Ryc. 22. Hydroliza kwasowa klotrymazolu [72, 79-81]

Thoma i Kübler w latach 1996-1997 opublikowali cykl prac [131-134], których tematyką była **fotodegradacja** leków, wśród przebadanych leków przeciwgrzybiczych znalazły się także pochodne azolu. Pochodne azolu w roztworach metanolowych (2-10 mg/100 ml) poddawane były działaniu światła UV w zakresie 290-360 nm.

Badacze stwierdzili, iż klotrymazol należy do najbardziej odpornych na promieniowanie UV, a ketokonazol jest związkiem najbardziej wrażliwym na to promieniowanie [133,137], gdyż już po godzinie naświetlania metanolowego roztworu ketokonazolu zaobserwowano jego całkowity rozkład – Ryc. 23. Niestety, identyfikacja produktów rozkładu nie była tematem powyższego cyklu prac.



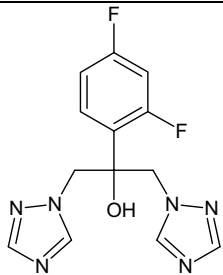
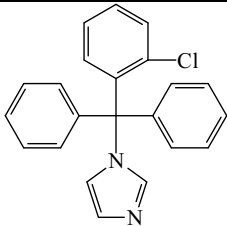
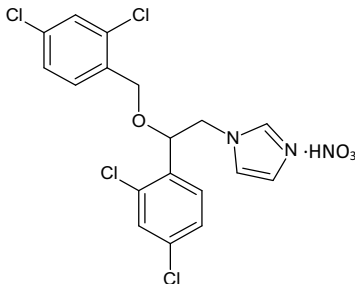
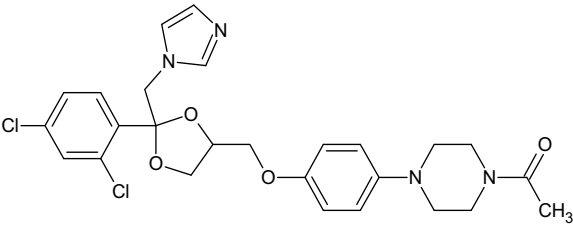
Ryc. 23. Fotodegradacja ketokonazolu (roztwór metanolowy 10mg/100ml) [133,137]

4. Część doświadczalna

4.1. Materiał do badań

Materiał do badań stanowiły cztery pochodne azolu o działaniu przeciwgrzybiczym, których charakterystykę przedstawiono w Tabeli 4.

Tabela 4. Charakterystyka 4 pochodnych azolu o działaniu przeciwgrzybiczym uszeregowanych wg wzrastającej masy molowej

Symbol	Wzór strukturalny	Masa molowa [g/mol]	Temp. topnienia [°C]	λ_{\max} [nm]
FK		306,2	139-143*	261, 266 ^a ; 261, 267 ^b
CK		344,8	141-145 [13,138]	254, 260 ^c
MK		479,1	178-184 [13,138]	264, 272, 280 ^c
KK		531,4	148-152 [13,138]	269 ^a ; 287 ^b ; 244, 296 ^c

*badania własne (DSC); ^awodne roztwory kwasowe; ^bwodne roztwory zasadowe; ^croztwory metanolowe

Flukonazol FK

Nazwa łacińska: Fluconazolum

Nazwa angielska: Fluconazole

Nazwa chemiczna: 2-(2,4-Difluorofenylo)-1,3-bis(1H-1,2,4-triazol-1-ilo)-2-propanol
[wg IUPAC, wg 13]

Wzór sumaryczny: C₁₃H₁₂F₂N₆O

Zawartość: 100%

Nr serii: FL02004

Pochodzenie: Pliva Kraków S.A.

Ketokonazol KK

Nazwa łacińska: Ketoconazolum

Nazwa angielska: Ketoconazole

Nazwa chemiczna: 1-acetylo-4-[4-[[[(2RS,4SR)-2-(2,4-dichlorofenylo)-2-(1H-imidazolo-1-ylometylo)-1,3-dioksolan-4-ylo]metoksy]fenylo]piperazyna [13]
1-[4-[4-[[2-(2,4-dichlorofenylo)-2-(imidazol-1-ylometylo)-1,3-dioksolan-4-ylo]metoksy]fenylo]piperazyn-1-ylo]etanon [wg IUPAC]

Wzór sumaryczny: C₂₆H₂₈Cl₂N₄O₄

Zawartość: 99,8%

Nr serii: 103806009

Pochodzenie: PPF Hasco-Lek S.A. Wrocław

Klotrymazol CK

Nazwa łacińska: Clotrimazolum

Nazwa angielska: Clotrimazole

Nazwa chemiczna: Difenylo-(2-chlorofenylo)-1-imidazolylometan [13]
1-[(2-Chlorofenylo)difenylometylo]-1H-imidazol [wg IUPAC]

Wzór sumaryczny: C₂₂H₁₇ClN₂

Zawartość: > 99 %

Nr serii: 114K0749

Pochodzenie: Sigma

Azotan mikonazolu MK

Nazwa łacińska: Miconazoli nitras

Nazwa angielska: Miconazole nitrate

Nazwa chemiczna: azotan 1-[(2RS)-2-[(2,4-dichlorobenzyl)oksy]-2-(2,4dichlorofenylo)-ethylo]-1H- imidazolu [13]
azotan 1-[2-(2,4-dichlorofentylo)-2-[(2,4-dichlofenylo)metoksy]etylo] imidazolu [wg IUPAC]

Wzór sumaryczny: C₁₈H₁₅Cl₄N₃O₄ · HNO₃

Zawartość: 100 %

Nr serii: 017K1518

Pochodzenie: Sigma-Aldrich

4.2. Odczynniki i substancje wzorcowe

Do badań zastosowano następujące odczynniki chemiczne:

- Aceton POCH, cz. d. a.
- Acetonitryl MERCK, super gradient
- Amoniak 25 % roztwór wodny POCH, cz. d. a.
- Chlorek etylenu POCH, cz. d. a.
- Chloroform POCH, cz. d. a.
- Deuterowany dimetylosulfotlenek (DMSO-d₆) cz. d. a.
- Deuterowany trichlorometan (CDCl₃) cz. d. a.
- Hel
- KBr Sigma-Aldrich cz. do spektroskopii
- KH₂PO₄ POCH, cz. d. a.
- Metanol POCH, cz. d. a.
- NaH₂PO₄ x H₂O POCH, cz. d. a.
- Tetrametylosilan (TMS) POCH cz. d. a. - standard wewnętrzny do kalibrowania przesunięcia chemicznego w spektrometrii NMR
- Toluen POCH, cz. d. a.
- Woda destylowana

Wzorce:

- Miconazole nitrate (European Pharmacopeia Standard), LGC Standards
- Clotrimazole (European Pharmacopeia Standard), LGC Standards
- Clotrimazole Related Compound A, (2-chlorophenyl)-diphenylmethanol (United States Pharmacopeia Standard), LGC Standards
- Clotrimazole Related Compound E, 2-chlorobenzophenone (European Pharmacopeia Standard), LGC Standards
- Fluconazole (European Pharmacopeia Standard), LGC Standards
- Imidazole, Fluka, content > 99.5 %
- Ketoconazole (European Pharmacopeia Standard), LGC Standards

4.3. Aparatura badawcza

Wpływ promieniowania jonizującego na badane azolu analizowano przy użyciu następującej aparatury badawczej:

- Chromatograf cieczowy LC-20 Shimadzu z detektorem MS 4000Q TRAP
- Chromatograf cieczowy Waters 616 z detektorem fotodiodowym UV-VIS Waters 996
- Dyfraktometr rentgenowski Bruker AXS D8 Advance
- Liniowy akcelerator elektronów LAE 13/9
- Mikroskop elektronowy Philips SEM 515
- pH-metr Mettler Toledo MP 225
- Różnicowy kalorymetr skaningowy DSC 204 Phoenix
- Spektrofotometr FT-IR IRAffinity
- Spektrofotometr UV-VIS Perkin Elmer Lambda 20
- Spektrometr EPR Bruker EMX-10
- Spektrometr Intectra Mass AMD 604
- Spektrometr NMR Bruker Advance 600 MHz
- Tabletkarka Pye Unicam

Wykorzystano także poniższy sprzęt laboratoryjny i materiały nietrwale:

- Fiolki ze szkła bezbarwnego o pojemności 4 cm³ z korkiem z tworzywa sztucznego
- Kolby miarowe o pojemności 5, 10 i 25 cm³
- Komory do chromatografii TLC różnej wielkości
- Kuwety kwarcowe o grubości warstwy 1 cm
- Lampa analityczna o długości fali $\lambda=254$ i 360 nm
- Mikrostrzykawkki Hamiltona o pojemności 25 i 50 μ l
- Moździerz agatowy wraz z pistlem
- Pipety na 1, 2, 5 i 10 cm³
- Płytki do chromatografii TLC Kieselgel F₂₅₄ firmy Merck rozmiar 20 cm×20 cm, 4cm×15 cm, i 3cm×10 cm
- Waga analityczna Mettler Toledo AG 204
- Waga analityczna torsyjna (0-50 i 0-500) – WT typ PRL T-4
- Zlewki szklane różnej wielkości

4.4. Metodyka badań

Wybrane do badań cztery pochodne azolu, poddano ekspozycji promieniowaniem jonizującym z akceleratora, a następnie badaniom analitycznym, jednocześnie ze związkami nienapromieniowanymi, używając w pierwszej kolejności metod bezpośrednich tzn. niewymagających żadnej obróbki wstępnej, np. przeprowadzenia próbki do roztworu.

Zastosowano następujące metody bezpośrednie:

- analizę wagową
- badania organoleptyczne (postać, barwa, zapach)
- badania SEM
- badania XRD
- badania DSC,
- badania FT-IR
- badania MS
- badania EPR

a następnie metody pośrednie:

- pomiary rozpuszczalności, klarowności i zabarwienia roztworów
- pomiar pH
- metody spektrofotometryczne UV i NMR
- metody chromatograficzne TLC, HPLC
- metody chromatograficzno-spektrometryczne HPLC-MS

4.4.1. Przygotowanie próbek

FK, KK, CK i MK *in substantia* odważono w ilości około 0,5 g z dokładnością do 0,0001 g do wytarowanych bezbarwnych fiolek szklanych o pojemności 4 cm³. Fiolki zamknięto plastikowymi korkami, opisano i ponownie zważono.

4.4.2. Ekspozycja na promieniowanie jonizujące

Przygotowane próbki poddano działaniu promieniowania jonizującego w temperaturze pokojowej i atmosferze powietrza w liniowym akceleratorze elektronów LAE 13/9 za pomocą wiązki elektronów o energii 9,96 MeV (prąd wiązki wynosił 6,2 μA, moc źródła 10 kGy/s, a temperatura procesu ≤ 35 °C). Badane pochodne azolu napromieniowano następującymi dawkami: 25, 50, 100, 200, 400 i 800 kGy.

4.4.3. Analiza wagowa

Próbki odważono na wadze analitycznej Mettler Toledo AG 204 przed i po napromieniowaniu z dokładnością do 0,0001. Masy próbek porównano i obliczono bezwzględną oraz procentową zmianę masy po napromieniowaniu. Analizę wagową przeprowadzono po upływie 3 dni od napromieniowania.

4.4.4. Analiza organoleptyczna

Badanie organoleptyczne przeprowadzono według zaleceń Farmakopei Polskiej VIII [13]. Oceniano postać, barwę, zapach rozpuszczalność oraz klarowność i zabarwienie roztworów badanych związków przed i po napromieniowaniu. Analizę organoleptyczną przeprowadzono po upływie 3 dni od napromieniowania.

4.4.5. Pomiar pH

Wykonano również pomiar pH zgodnie z zaleceniami Farmakopei Polskiej VIII [13] przy użyciu pehametru Mettler Toledo MP 225 z elektrodą szklaną, w temperaturze $24,5 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$. Pehametr skalowano za pomocą roztworów buforowych o pH 4 i pH 7. Pomiarów dokonano dla flukonazolu przed i po napromieniowaniu w roztworach o stężeniu 5 mg/ml tj. 0,5%. Pomiarów przeprowadzono po upływie 5 dni od napromieniowania.

4.5. Metody badań

4.5.1. Metody bezpośrednie

4.5.1.1. Skaningowy mikroskop elektronowy (SEM)

Ogląd mikroskopowy badanych pochodnych azolu wykonano przy użyciu mikroskopu elektronowego firmy Philips typu SEM 515 (natężenie przyspieszające wynosiło 3 - 10 kV, droga optyczna 14 mm). Pomiarów przeprowadzono 7 dni po napromieniowaniu.

4.5.1.2. Dyfrakcja promieniowania rentgenowskiego (XRD)

Dyfraktogramy proszkowe badanych pochodnych azolu wykonano przed i po napromieniowaniu, stosując promieniowanie rentgenowskie CuK_{α} ($\lambda = 1,5406 \text{ \AA}$) w zakresie $2\theta = 2 - 50^{\circ}$. Pomiarów dokonano na dyfraktometrze proszkowym firmy Bruker model

AXS D8 Advance zaopatrzonym w monochromator Johanssona oraz detektor paskowy LynxEye, po upływie 1 miesiąca od napromieniowania.

4.5.1.3. Różnicowa kalorymetria skaningowa (DSC)

Analizę kalorymetryczną badanych pochodnych azolu przed i po napromieniowaniu wykonano na kalorymetrze DSC-204 firmy Netsch. Próbki związków wyjściowych i napromieniowanych, odważonych w ilości $10 \text{ mg} \pm 10\%$, umieszczono w hermetycznie zamykanych kapsułkach aluminiowych. Pomiarów prowadzono w atmosferze gazu obojętnego (hel) w zakresie od 20 do 300 °C, przy szybkości ogrzewania 5°C/min po upływie 2 miesięcy od napromieniowania.

4.5.1.4. Spektrofotometria w podczerwieni (FT-IR)

Na wadze torsyjnej odważono 1 mg badanych pochodnych azolu z dokładnością do 0,05 mg (przed i po napromieniowaniu) oraz 300 mg KBr wysuszonego uprzednio w temperaturze 600°C. Następnie oba składniki utarto w moździerzu agatowym w celu uzyskania jednorodnego rozdrobnienia, po czym wykonano tabletkę o wymiarach 1,3 x 0,1 cm przy użyciu tabletkarki PYE UNICAM. Tabletkę odniesienia wykonano z samego KBr, a następnie wykreślono widma w podczerwieni w zakresie od 4000 do 400 cm^{-1} na spektrofotometrze FT-IR IRAffinity firmy Shimadzu. Pomiarów przeprowadzono po upływie 2 miesięcy od napromieniowania.

4.5.1.5. Spektrometria mas (MS)

Widma mas badanych związków przed i po napromieniowaniu dawką 400 kGy (masa odważki 1 mg) wykonano na spektrometrze Intectra Mass AMD 604 w warunkach standardowych tzn. przy zastosowaniu jonizacji elektronowej (EI) strumieniem elektronów o energii 70 eV (napięcie = 70 V). Powstałe jony skanowano w zakresie od 50 do 550 Da. Pomiarów przeprowadzono po upływie 1 miesiąca od napromieniowania.

4.5.1.6. Spektrometria elektronowego rezonansu magnetycznego (EPR)

Eksperymenty elektronowego rezonansu paramagnetycznego wykonano dla nienapromieniowanych i napromieniowanych pochodnych azolu w postaci proszku w kapilarach kwarcowych o średnicy 4 mm firmy Wilmad. Pomiarów przeprowadzono w temperaturze pokojowej na spektrometrze EPR model EMX-10 firmy Bruker, pracującym w paśmie X mikrofal (9.4 GHz) przy częstotliwości drugiej

modulacji 100 kHz, o czułości 1×10^{10} spinów/cm³. Pomiaru indukcji pola magnetycznego dokonano z dokładnością do 0,001 mT, a pomiaru częstości mikrofal z dokładnością do 0,001 GHz. Wszystkie pomiary wykonano przy następujących ustawieniach spektrometru: pole centralne: 344 mT, szerokość sweepu: 20 mT, wzmacnienie: 2×10^5 , modulacja amplitudy: 0,1 mT, czas konwersji: 163,840 ms, stała czasowa: 1310,720 ms. Badanie prowadzono od 1 do 355 dnia od napromieniowania.

Ponieważ tworzące się wolne rodniki są mierzalnym efektem powstającym w wyniku oddziaływania wiązki wysokoenergetycznych elektronów na związki lecznicze pochodne azolu, można obliczyć wydajność radiolityczną tej reakcji.

Wydajność radiolityczna (G) jest to stosunek liczby cząsteczek powstających produktów lub zanikających substratów do ilości zaabsorbowanej przez układ energii promieniowania.

Wydajność radiolityczna tworzenia się wolnych rodników (G_{WR}) jest stosunkiem liczby wolnych rodników powstających pod wpływem promieniowania jonizującego o energii 100 eV.

Obliczono ją wg wzoru:

$$G_{WR} = \frac{x}{100 eV}$$

G_{WR} - wydajność radiolityczna tworzenia się wolnych rodników

x - liczba tworzących się wolnych rodników pod wpływem energii 100 eV

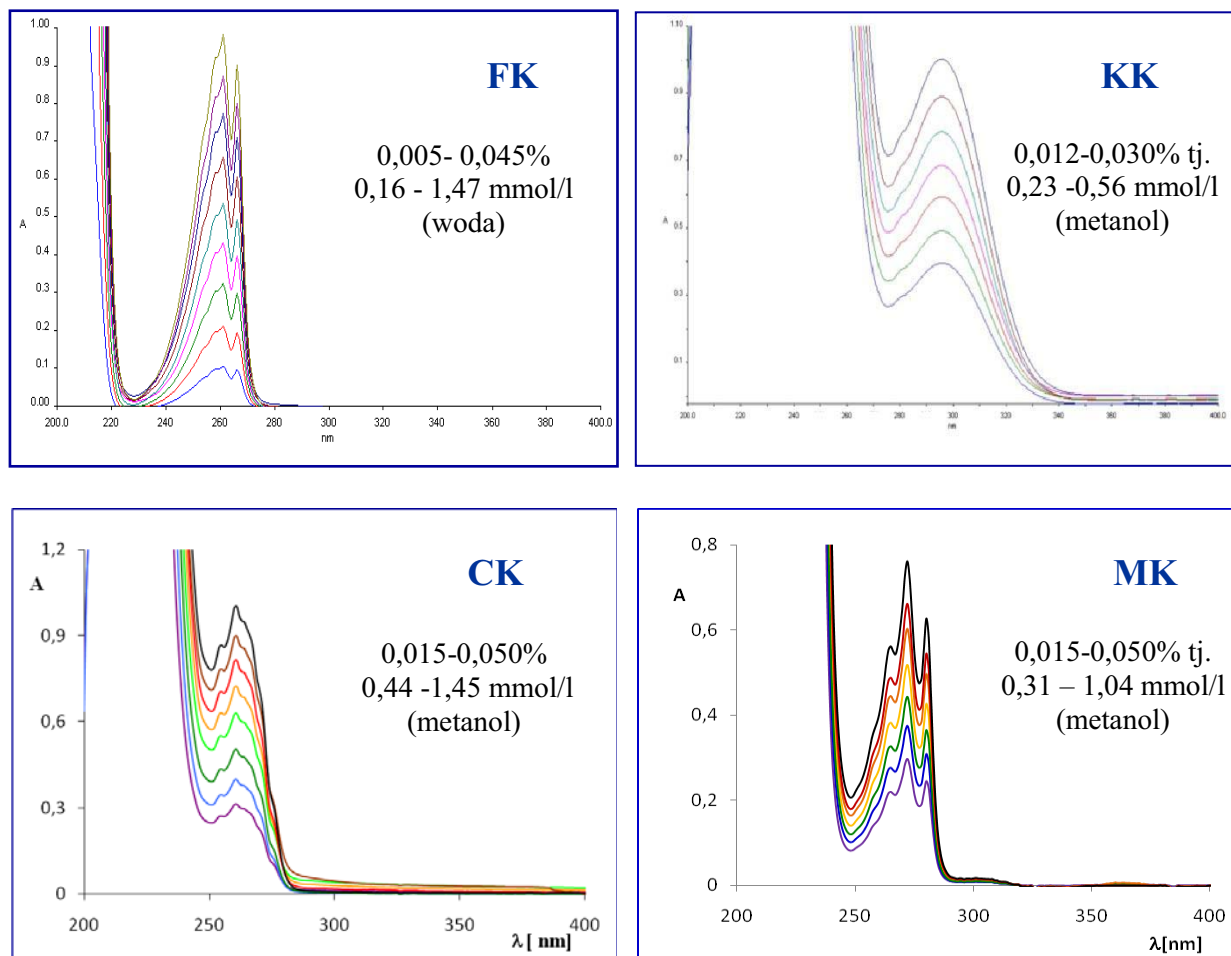
1 kGy = 100 Gy 1 Gy = 100 rad 1 rad = $6,243 \times 10^{13}$ eV/g

4.5.2. Metody pośrednie

4.5.2.1. Spektrofotometria w nadfiolecie (UV)

Badane pochodne azolu odważono w ilości od 0,015 g do 0,025 g z dokładnością do 0,0001 g. Następnie rozpuszczono w metanolu w kolbkach miarowych o pojemności 50 cm³, a otrzymane roztwory rozcieńczono pobierając od 1 cm³ do 9 cm³ do kolbek miarowych o pojemności 10 cm³ i uzupełniano metanolem (lub wodą w przypadku FK). Absorbancję otrzymanych roztworów mierzono przy użyciu spektrofotometru UV-VIS Perkin Elmer Lambda 20 w kuwetach kwarcowych o grubości warstwy roztworu badanego 1 cm w zakresie od 200 do 400 nm. Próba odniesienia był użyty rozpuszczalnik.

Otrzymano widma w poniższych zakresach stężeń (Ryc. 24.):



Ryc. 24. Widma UV badanych pochodnych azolu

Walidację metody oznaczania pochodnych azolu za pomocą spektrofotometrii w nadfiolecie przeprowadzono na związkach nienapromieniowanych, określając takie parametry jak:

- **precyzję metody** (ang. *precision*) oceniając statystycznie wartości średniej pomiaru absorpcji)
- **liniowość metody** (ang. *linearity*)
- **dokładność metody** (ang. *accuracy*) dokonując pomiarów absorbancji roztworów badanych związków przy trzech zakresach stężeń z trzech niezależnych odważek
- **granice wykrywalności** (ang. *limit of detection*) korzystając ze wzoru

$$LOD = \frac{3,3 \cdot s_y}{a}$$

- **granice oznaczalności** (ang. *limit of quantitation*) korzystając ze wzoru

$$LOQ = \frac{10 \cdot s_y}{a}$$

- **powtarzalność metody**, stosując test F–Snedecora w celu oceny jednorodności dwóch wariacji oraz test t–Studenta w celu oceny różnic między wartościami średnimi.

Uzyskane parametry statystyczne zestawiono w Tabelach 5 i 6.

Tabela 5. Ocena statystyczna krzywych wzorcowych

Parametry regresji	FK	KK	CK	MK	
	λ_{\max} 261 [nm]	λ_{\max} 296 [nm]	λ_{\max} 261 [nm]	λ_{\max} 272 [nm]	λ_{\max} 280 [nm]
Równanie prostej	$y = a \cdot x + b$				
n	9	9	9	10	10
a	21,76 ± 0,25	33,41 ± 0,63	19,94 ± 0,95	13,24 ± 0,23	12,29 ± 0,25
b	0,004 ± 0,007	-0,006 ± 0,014	0,016 ± 0,033	0,011 ± 0,008	-0,015 ± 0,019
s_a	0,106	0,246	0,387	0,224	0,961
s_b	0,003	0,005	0,013	0,006	0,028
s_y	0,004	0,004	0,013	0,009	0,038
T_a	54,34	135,89	51,26	59,14	12,78
t_b	1,395	-1,157	1,178	1,775	-0,525
r	0,9999	0,9999	0,9989	0,9990	0,9804
Równanie prostej	$y = a \cdot x$				
a	21,64 ± 0,24	33,13 ± 0,58	20,27 ± 0,88	13,59 ± 0,23	11,85 ± 0,23
s_a	0,099	0,358	0,136	0,209	0,899
s_y	0,004	0,012	0,005	0,008	0,036
r	0,9999	0,9999	0,9989	0,9990	0,9804

Tabela 6. Zestawienie parametrów charakteryzujących metodę oznaczania badanych pochodnych azolu za pomocą spektrofotometrii w UV

Parametr walidacji	Związek badany				
	FK	KK	CK	MK	
	Analityczna długość fali [nm]				
	261	296	261	272	280
Precyzja	$s = 0,0120$ $s_x = 0,0350$ $W_z = 1,36\%$	$s = 0,0071$ $s_x = 0,0024$ $W_z = 0,85\%$	$s = 0,0015$ $s_x = 0,0005$ $W_z = 0,26\%$	$s = 0,1960$ $s_x = 0,0653$ $W_z = 1,19\%$	$s = 0,1695$ $s_x = 0,0565$ $W_z = 1,51\%$
Liniiowość r	0,9999	0,9999	0,9989	0,9990	0,9804
Dokładność (odzysk) [%]	99,58	99,87	99,26	100,36	100,38
Powtarzalność	$F = 1,37$ $t = 1,21$	$F = 1,32$ $t = 1,77$	$F = 1,49$ $t = 1,54$	$F = 0,56$ $t = 1,92$	$F = 1,06$ $t = 2,24$
Wykrywalność [%]	$6,1 \times 10^{-4}$	$6,1 \times 10^{-4}$	$8,20 \times 10^{-4}$	$1,94 \times 10^{-3}$	$1,00 \times 10^{-3}$
Oznaczalność [%]	$1,85 \times 10^{-3}$	$1,21 \times 10^{-3}$	$2,48 \times 10^{-3}$	$5,89 \times 10^{-3}$	$3,04 \times 10^{-3}$

4.5.2.2. Spektrometria jądrowego rezonansu magnetycznego (NMR)

Badane substancje odważono w ilości ok. 10 mg, FK, KK, CK rozpuszczono w deuterowanym trichlorometanie (CDCl_3), MK zaś w dimetylosulfotlenku (DMSO-d_6), a następnie otrzymane roztwory przeniesiono do kwarcowych kapilar, które umieszczono w spektrometrze Avance 500 firmy Bruker pracującym z częstotliwością 400,13 MHz, wyposażonym w QNP (Quad Nucleus Probe) i dokonano rejestracji widm ^1H - i ^{13}C -NMR. Przesunięcia chemiczne podano w częściach na milion (ppm) z sygnałem TMS jako wzorcem. W analizie ^{13}C -NMR użyto techniki DEPT 135, która umożliwia określenie rzędowości poszczególnych atomów węgla (I i III rzędowe atomy węgla dają sygnał dodatni, II rzędowa ujemny, a IV rzędowe nie dają sygnału w tej technice). Pomiarzy przeprowadzono po upływie 6 miesięcy od napromieniowania.

4.5.2.3. Chromatografia cienkowarstwowa (TLC)

Analizę chromatograficzną badanych pochodnych azolu przeprowadzono metodą TLC na płytkach pokrytych żelazem krzemionkowym Kieselgel 60F₂₅₄ o grubości warstwy 0,25 mm

i wymiarach 4×15 cm lub 20×20 cm. Na płytki nałożono metanolowe roztwory badanych związków (nienapromieniowanych i napromieniowanych) o stężeniu 10 mg/ml za pomocą strzykawki Hamiltona w ilości 25, 50 lub 100 μl , co odpowiadało 0,25; 0,5 lub 1,0 mg substancji badanej. Następnie płytki rozwijano na drodze 13 lub 17 cm w czasie od 45 minut do 3 godzin w temperaturze pokojowej.

W badaniach zastosowano następujące fazy ruchome:

- chloroform-aceton-metanol- 25% amoniak (4:4:1:0,1 v/v)
- chloroform-metanol-woda (13,3:1,5:0,2 v/v/v)
- toluen-metanol-25% amoniak (64:16:0,1 v/v/v)
- chlorek etylenu-aceton (1:1 v/v)
- toluen-metanol (4:1 v/v)

Po wysuszeniu rozwiniętych chromatogramów plamy uwidoczniono w świetle lampy UV o długości fali 254 nm.

4.5.2.4. Chromatografia cieczowa (HPLC)

Analizę chromatograficzną metodą HPLC przeprowadzono na chromatografie cieczowym Waters 616 z detektorem fotodiodowym UV-VIS Waters 996. Warunki rozdzielania badanych pochodnych azolu przedstawiono w Tabeli 7. Szybkość przepływu fazy ruchomej dla wszystkich przypadkach (oprócz FK: 1,5 ml/min) wynosiła 1 ml/min.

Tabela 7. Warunki rozdzielania badanych pochodnych azolu metodą HPLC

Badany związek	Kolumna	Faza ruchoma	Objętość nastrzyku [μl]	Typ elucji	Długość fali detektora [nm]
FK	Purosphere STAR RP-18 55 x 4 mm	$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ - metanol - acetonitryl (82,7:7,1:10,2, v/v/v)	20 μl	izokratyczna 1,5 ml/min	254 nm
KK	XTerra RP C ₁₈ 3,9 x 250 mm	Bufor fosforanowy* - acetonitryl (50:50 v/v)	5 μl	gradientowy	243 nm
CK	XTerra RP C ₁₈ 3,9 x 250 mm	Bufor fosforanowy* - acetonitryl (50:50 v/v)	5 μl	izokratyczna 1 ml/min	260 nm
MK	XTerra RP C ₁₈ 3,9 x 250 mm	Bufor fosforanowy* - acetonitryl (50:50 v/v)	5 μl	izokratyczna 1 ml/min	260 nm

*Bufor fosforanowy: 20 mmol/l KH_2PO_4 w mieszaninie woda – acetonitryl 80:20

Walidację metody oznaczania badanych pochodnych azolu za pomocą HPLC przeprowadzono, w podobny sposób jak walidację metody UV, wyznaczając takie parametry jak precyzję, liniowość, granicę oznaczalności i wykrywalności. Otrzymane wyniki dla wszystkich związków charakteryzowały się odpowiednimi dla tego typu oznaczeń parametrami statystycznymi:

- odchyleniem standardowym $s < 5,76 \times 10^{-2}$,
- współczynnikiem zmienności $W_z < 2,00\%$,
- granicą wykrywalności $LOD < 0,14 \text{ mg/l}$,
- granicą oznaczalności $LOQ < 0,42 \text{ mg/l}$
- liniowością w zakresie od $6,25 \times 10^{-3} \text{ mg/ml}$ do $25,0 \times 10^{-2} \text{ mg/ml}$

Uzyskane wyniki pozwoliły na wyznaczenie **wydajności radiolitycznej** procesu radiodegradacji pochodnych azolu, tj. obliczono stosunek zanikających cząsteczek badanego związku do ilości zaabsorbowanej przez układ energii promieniowania, np. wydajność radiolityczna G_{FK} jest stosunkiem zanikających cząsteczek flukonazolu pod wpływem zaabsorbowania promieniowania jonizującego o energii 100 eV. W obliczeniach korzystano ze wzoru podanego w punkcie 4.5.1.7.

4.5.2.5. Chromatografia ciekłowa łączona ze spektrometrią mas (HPLC-MS)

Analizę chromatograficzną metodą HPLC-MS przeprowadzono na chromatografie ciekłowej Prominence LC-20 firmy Shimadzu (z detekcją UV: 220-254 nm), sprzężonym ze spektrometrem mas 4000Q TRAP (Applied Biosystems). Uzyskane dane analizowano za pomocą programu Analyst 1.4.2.

Rozdział chromatograficzny przeprowadzono na kolumnie ZORBAX Eclipse XDB C8 o wymiarach 4,6 mm x 150 mm i wielkości porów 5 μm . Fazę ruchomą stanowiła mieszanina roztworu A (woda z 0,1% HCOONH_4) oraz roztworu B (metanol z 0,1% HCOONH_4). Proporcje między roztworem A a B były następujące: 3:7 dla CK i KK, 2:8 dla MK i 1:1 dla FK. Szybkość przepływu fazy ruchomej przez kolumnę wynosiła 1 ml/min. Analizę prowadzono w temperaturze pokojowej.

Rozdzielone na kolumnie chromatograficznej produkty rozkładu i wprowadzono do spektrometru mas, gdzie zastosowano jonizację z wykorzystaniem elektrospreju, temperatura jonizacji: 550 °C, napięcie (IS) w trybie jonów dodatnich: 60 V (20 V dla CK), w trybie jonów ujemnych: -5500 V. Powstałe jony skanowano w zakresie od 80 do 700 Da.

4.6. Wyniki

4.6.1. Metody bezpośrednie

4.6.1.1. Analiza wagowa

Pomiary masy badanych związków wykonano przed i po napromieniowaniu w tych samych fiolkach szklanych, w których były odważone i napromieniowane, zgodnie z metodyką opisaną w rozdziale 4.4.1. Masa próbek wynosiła od 0,5 do 1,0 g (z dokładnością do 0,0001 g). Uzyskane wyniki przedstawiono w Tabeli 8.

Tabela 8. Zestawienie różnicy mas badanych pochodnych azolu przed i po napromieniowaniu

Symbol	Dawka [kGy]	Różnica mas	
		[mg]	[%]
CK	25	+ 0,3	+ 0,029
	50	+ 0,1	+ 0,009
	100	+ 0,2	+ 0,020
	200	- 0,3	- 0,028
	400	- 0,2	- 0,020
	800	+ 0,3	+ 0,030
FK	25	- 0,5	- 0,050
	50	+ 0,3	+ 0,030
	100	- 0,3	- 0,027
	200	- 0,4	- 0,040
	400	- 0,3	- 0,028
	800	+ 0,2	+ 0,018
MK	25	- 0,3	- 0,028
	50	- 0,3	- 0,059
	100	+ 0,2	+ 0,039
	200	+ 0,3	+ 0,059
	400	+ 0,6	+ 0,121
	800	- 0,3	- 0,031
KK	25	+ 0,3	+ 0,031
	50	- 0,3	- 0,060
	100	+ 0,7	+ 0,138
	200	- 0,2	+ 0,039
	400	- 0,3	- 0,060
	800	+ 0,3	+ 0,030

Największe różnice masy zaobserwowano dla KK napromieniowanego dawką 100 kGy (+ 0,138%), MK napromieniowanego dawką 400 kGy (+ 0,121%) oraz FK pod wpływem dawki 25 kGy (- 0,05%), co stanowiło 0,5-0,7 mg. Ponieważ obserwowane różnice są mniejsze niż błąd pomiaru ± 1 mg można uznać, że masa badanych związków nie uległa zmianie w procesie napromieniowania oraz że w trakcie tego procesu nie powstają związki lotne.

4.6.1.2 Analiza organoleptyczna

Ocenę organoleptyczną wykonano według wymagań FP VIII [13], porównując zapach, barwę, postać i klarowność wodnych (w przypadku FK) lub metanolowych (KK, CK, MK) roztworów napromieniowanych pochodnych azolu ze związkami nie poddanymi ekspozycji na promieniowanie jonizujące. Wszystkie badane pochodne przed napromieniowaniem były białymi, drobnokrystalicznymi proszkami, bez zapachu, a ich roztwory metanolowe (lub wodne w przypadku FK) były bezbarwne i klarowne (Tabela 8).

Stwierdzono, że postać, zapach, barwa i klarowność oraz zabarwienie roztworów badanych związków nie uległa zmianie po napromieniowaniu dawką 25 kGy (czyli standardowa dawka sterylizacyjna) z wyjątkiem FK, który w tych warunkach zabarwia się na kremowo, a w miarę wzrostu dawki przechodzi poprzez łososiowy i pomarańczowy do brązowego (Tabela 8). Najdłużej stałość białego zabarwienia zachowuje CK i MK, które aż do dawki 400 kGy pozostają białe, a następnie przybierają barwę kremową. KK wykazuje zmianę zabarwienia z białego na kremowe przy dawce 50 kGy.

Należy podkreślić, że wszystkie związki po napromieniowaniu (każdą dawką) tworzą po rozpuszczeniu bezbarwne roztwory (Tabela 9.).

Na tej podstawie można sądzić, że powstające na skutek napromieniowania zabarwienie związków nie jest przypuszczalnie spowodowane ani barwą powstających produktów radiodegradacji, ani zabawieniem wolnych rodników ponieważ w przeciwnym wypadku otrzymane roztwory byłyby także barwne, chyba że zarówno produkty radiol degradacji jak i wolne rodniki występują w tak małych stężeniach, że nie możemy tego zbadać organoleptyczne (czyli porównując je wizualnie za pomocą ludzkiego wzroku).

Tabela 9. Wyniki analizy organoleptycznej badanych pochodnych azolu wg szybkości zmiany zabarwienia

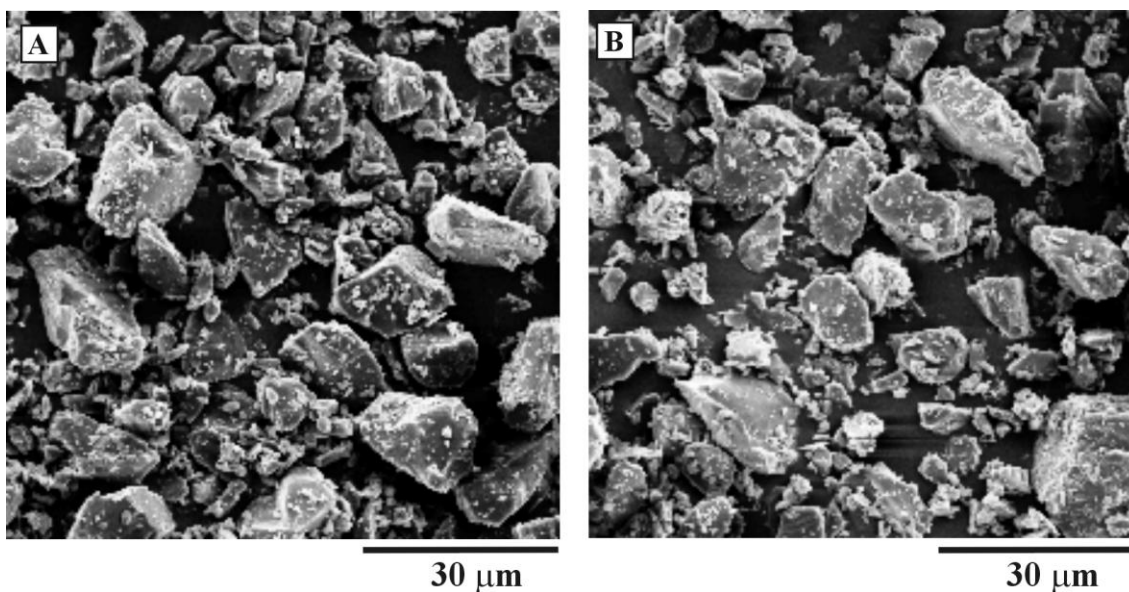
Symbol	Parametr analizy	Dawka [kGy]						
		0	25	50	100	200	400	800
CK	Barwa	biały					kremowy	
	Postać	krystaliczny proszek						
	Zapach	bez zapachu						
	Barwa i klarowność roztworów	bezbarwny, klarowny						
MK	Barwa	biały				kremowy	żółty	
	Postać	krystaliczny proszek						
	Zapach	bez zapachu						
	Barwa i klarowność roztworów	bezbarwny, klarowny						
KK	Barwa	biały	kremowy	łososiowy	brązowy			
	Postać	krystaliczny proszek						
	Zapach	bez zapachu						
	Barwa i klarowność roztworów	bezbarwny, klarowny						
FK	Barwa	biały	kremowy	łososiowy	pomarańczowy	brązowy		
	Postać	krystaliczny proszek						
	Zapach	bez zapachu						
	Barwa i klarowność roztworów	bezbarwny, klarowny						

4.6.1.3. Ogląd mikroskopowy (SEM)

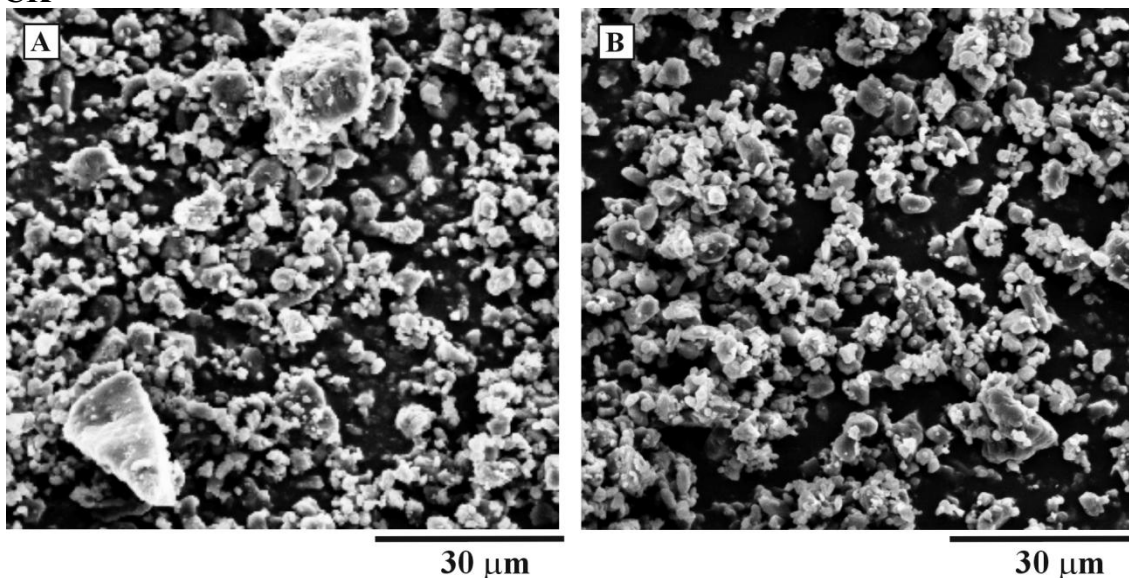
Badania mikroskopowe dla badanych pochodnych azolu wykonano zgodnie z metodyką opisaną w rozdziale 4.5.1.

Nie zaobserwowano zmian polegających na zbryleniu kryształów związków lub zmianie ich wielkości. Na Ryc. 25. przedstawiono mikrofotografie SEM wybranych związków.

KK



CK

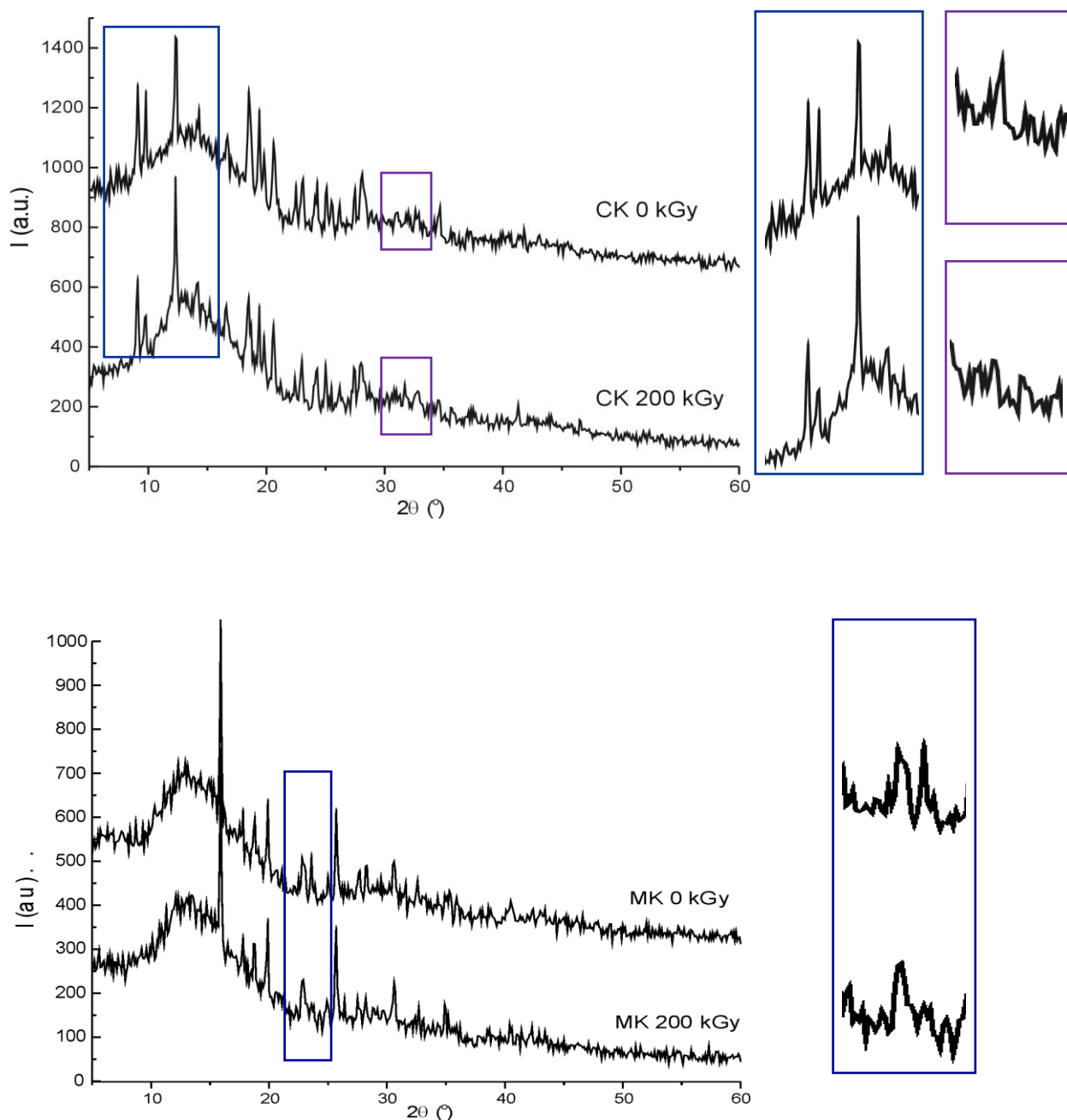


Ryc. 25. Mikrofotografie SEM dla KK i CK przed (A) i po napromieniowaniu (B) dawką 200 kGy

4.6.1.4. Analiza rentgenograficzna (XRD)

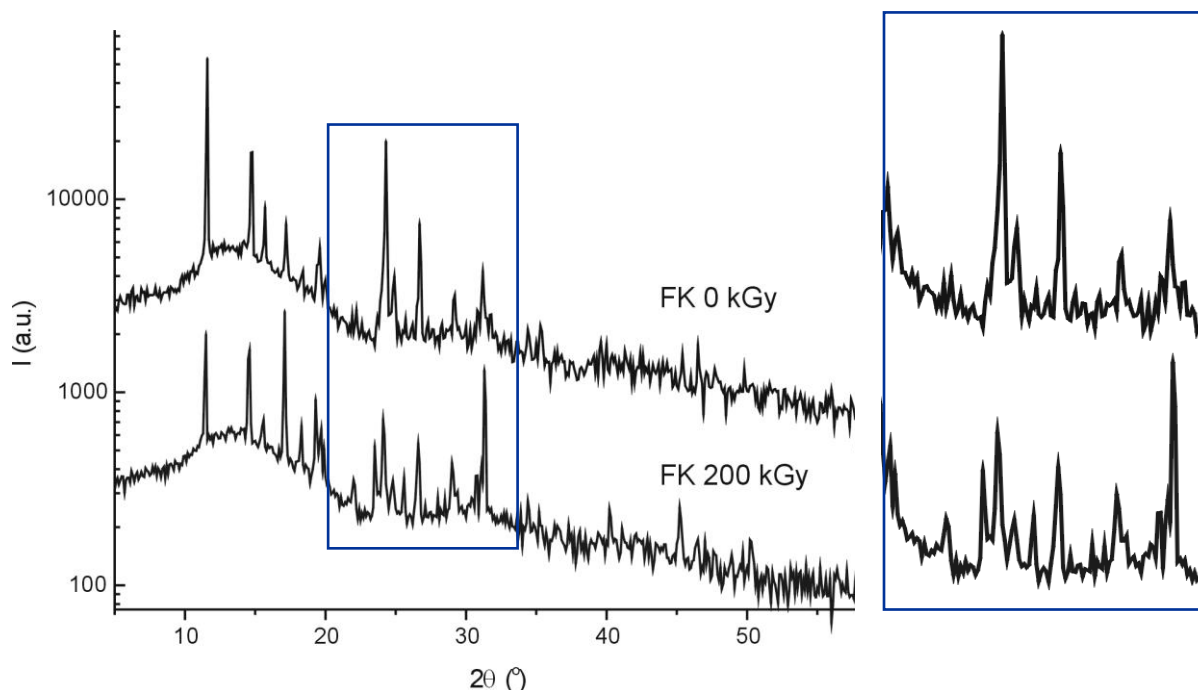
Rentgenogramy proszkowe badanych pochodnych azolu wykonano, zgodnie z metodyką opisaną w rozdziale 4.5.2., dla związków nienapromieniowanych i napromieniowanych dawką 200 kGy.

Stwierdzono, że KK nie wykazuje zmian w przebiegu dyfraktogramów po napromieniowaniu, dla CK i MK zaobserwowano niewielkie zmiany kształtu oraz intensywności niektórych pików widma (Ryc. 26.), odpowiednio w zakresie 3-16, 33-36 $2\theta^\circ$ i 21-25 $2\theta^\circ$.



Ryc. 26. Dyfraktogramy proszkowe dla CK i MK przed i po napromieniowaniu

Największe zmiany w przebiegu widma rentgenowskiego stwierdzono dla FK po napromieniowaniu, obejmowały one zakres $20-32\ 2\theta^\circ$ (Ryc. 27.).

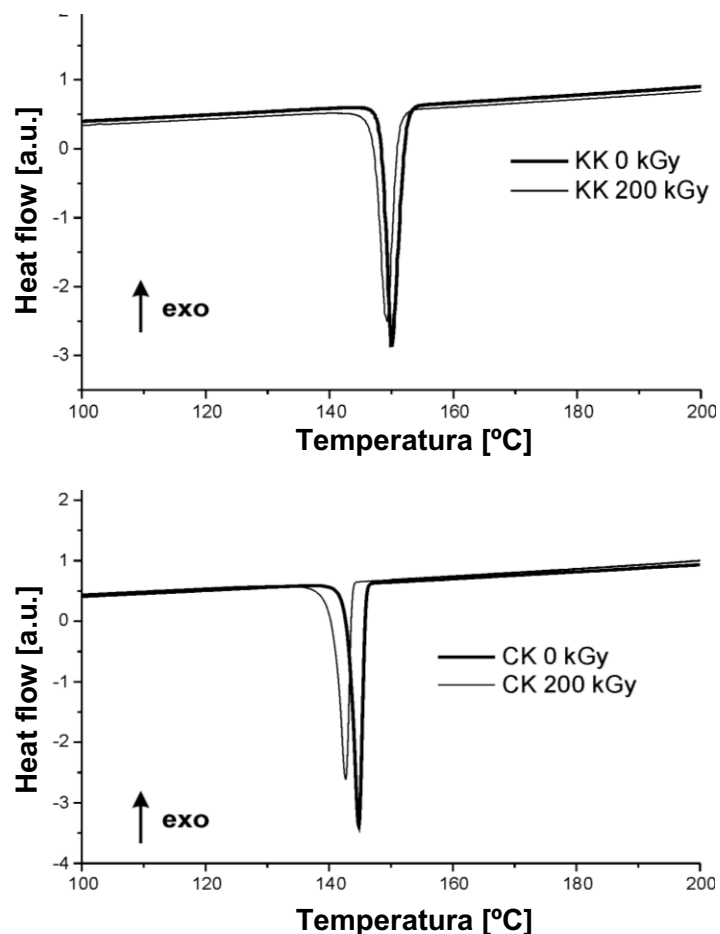


Ryc. 27. Dyfraktogramy proszkowe dla FK przed i po napromieniowaniu

W przypadku FK największe spośród badanych pochodnych azolu defekty sieci krystalograficznej i wyraźna, pomarańczowa barwa pod wpływem promieniowania jonizującego w dawce 200 kGy pozwalają na sformułowanie hipotezy, iż przyczyną barwy związku mogą być defekty sieci krystalicznej powstałe podczas przenikania wiązki elektronów przez próbkę badanego związku.

4.6.1.5. Różnicowa kalorymetria skaningowa (DSC)

Badania DSC pochodnych azolu wykonano zgodnie z metodyką opisaną w punkcie 4.5.1.3. Otrzymane krzywe DSC badanych związków przed i po napromieniowaniu przedstawiono na Ryc. 28 i 39, a uzyskane wartości temperatury topnienia oraz entalpii topnienia zestawiono w Tabelach 10-12.

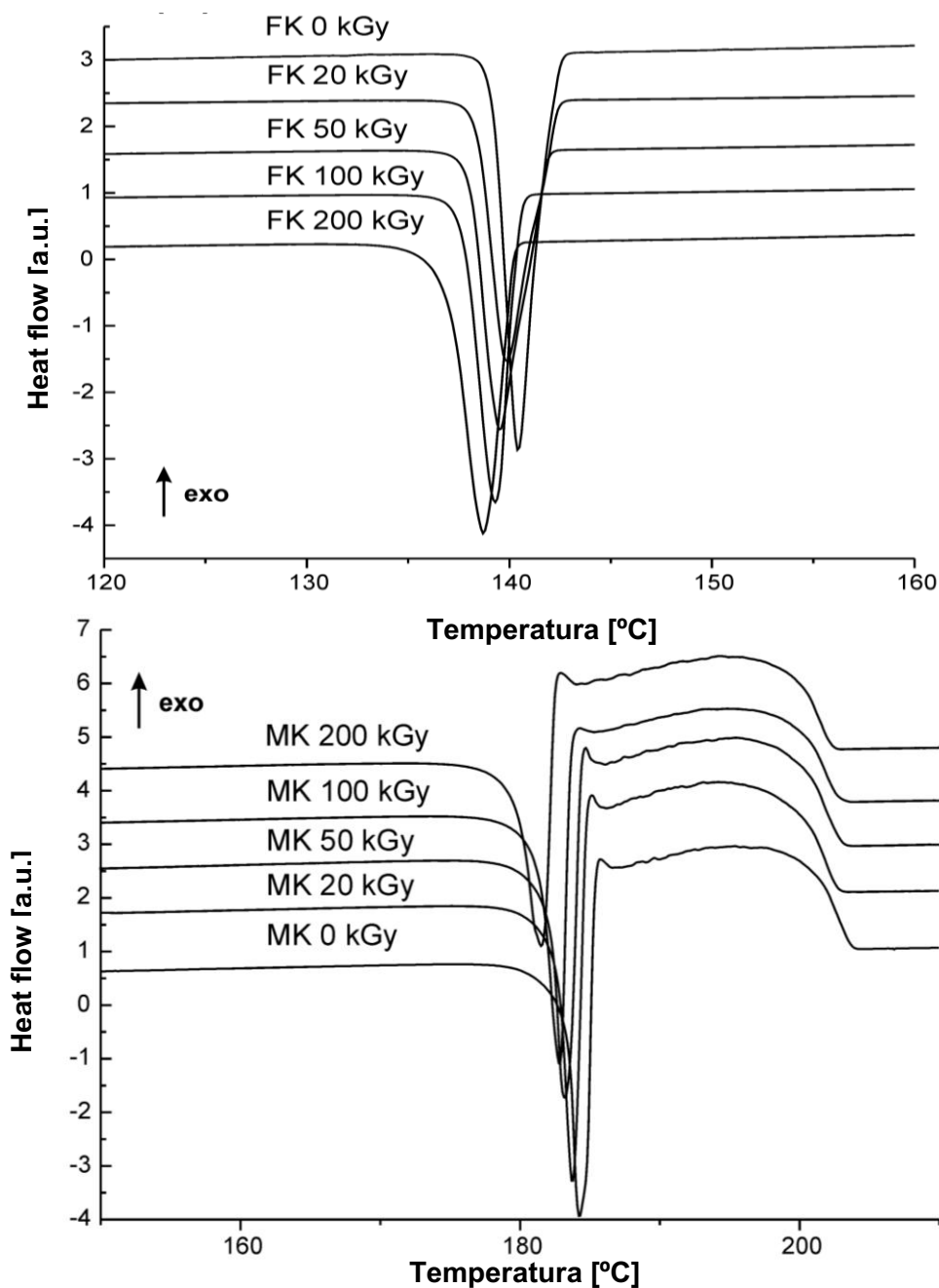


Ryc. 28. Krzywe DSC dla KK i CK przed i po napromieniowaniu

Tabela 10. Parametry piku topnienia badanych związków przed i po napromieniowaniu wyznaczone metodą DSC (uszeregowane wg wzrastającego przesunięcia temp. topn.)

Symbol związku	Temp. topn. [°C]	0 kGy		200 kGy		ΔT_{\max}^1 [°C]	$\Delta T_{\text{onset}}^2$ [°C]
		T_{\max} [°C]	T_{onset} [°C]	T_{\max} [°C]	T_{onset} [°C]		
KK	148-152*	150,0	148,3	149,3	147,1	-0,7	-1,2
CK	141-145*	144,8	142,9	142,7	140,7	-2,1	-2,2
FK	139-143**	140,5	139,2	138,4	136,9	-2,1	-2,3
MK	178-184*	184,4	183,3	181,5	179,5	-2,9	-3,8

* [13,138]; ** badania własne; $^1\Delta T_{\max} = T_{\max} 200 \text{ kGy} - T_{\max} 0 \text{ kGy}$ $^2\Delta T_{\text{onset}} = T_{\text{onset}} 200 \text{ kGy} - T_{\text{onset}} 0 \text{ kGy}$



Ryc. 29. Krzywe DSC dla FK i MK przed i po napromieniowaniu

Na podstawie analizy krzywych DSC stwierdzono, że wszystkie badane pochodne azolu wykazują typowy, endotermiczny pik topnienia, a w przypadku MK po procesie topnienia następuje proces egzotermiczny, związany najprawdopodobniej z rozkładem związku, co potwierdzają dane literaturowe [13].

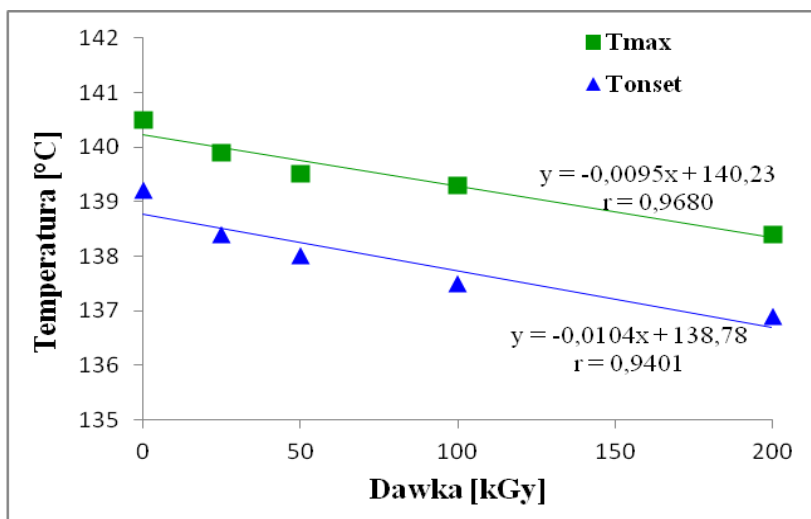
Wszystkie badane związki przed i po napromieniowaniu dawkami od 25 do 200 kGy wykazywały wyraźne przesunięcie piku odpowiadającego temperaturze topnienia w kierunku niższych temperatur. Wartość tego przesunięcia dla dawki 200 kGy mieściła się w granicach od 1,2°C dla FK do 3,8°C dla MK.

W przypadku FK i MK znaleziono korelację między temperaturą topnienia T_{\max} i T_{onset} oraz entalpią procesu (ΔH), a dawką promieniowania jonizującego (Ryc. 30 i 31).

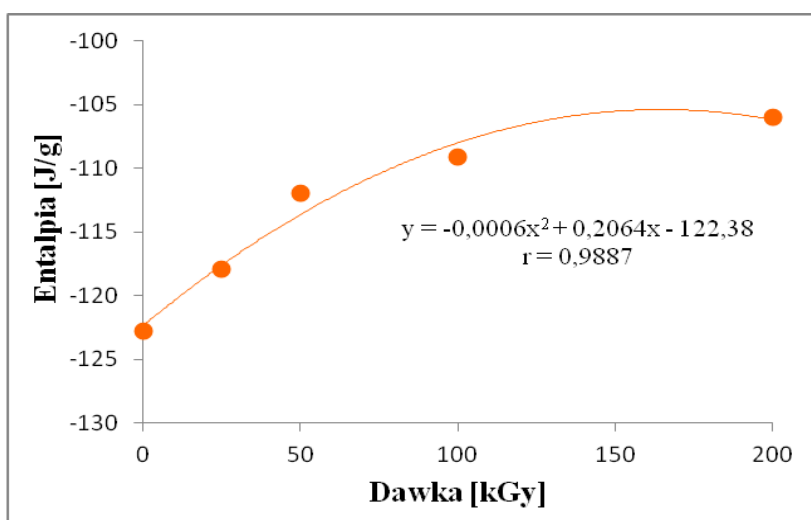
Tabela 11. Wyniki analizy DSC dla FK

Dawka [kGy]	ΔH [J/g]	T_{\max} [°C]	T_{onset} [°C]
0	-122,8	140,5	139,2
25	-117,9	139,9	138,4
50	-112,0	139,5	138,0
100	-109,1	139,3	137,5
200	-106,0	138,4	136,9

A.



B.

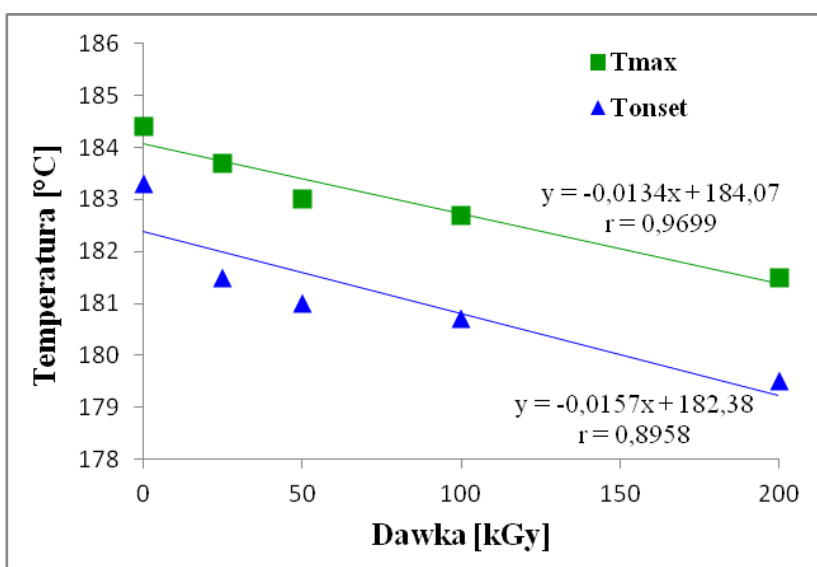


Ryc. 30. Zależności T_{\max} , T_{onset} (A) i ΔH (B) od dawki promieniowania dla FK

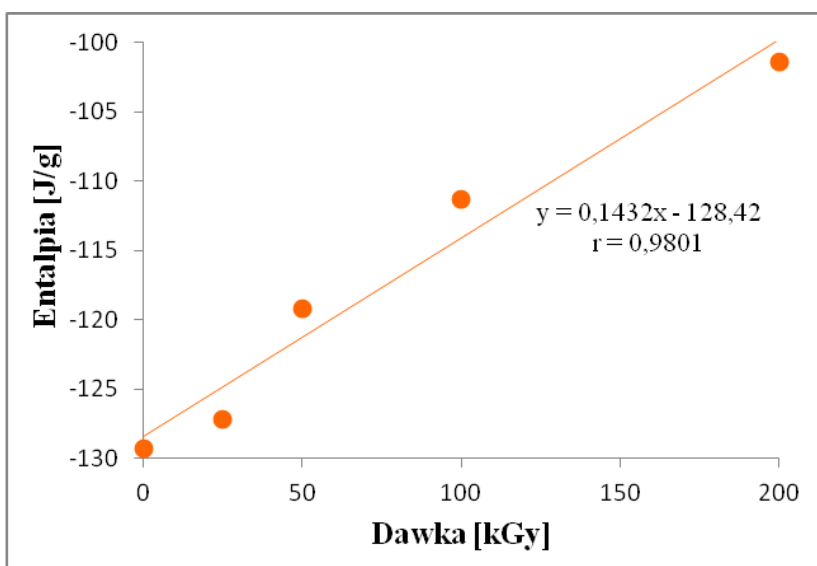
Tabela 12. Wyniki analizy DSC dla MK

Dawka [kGy]	ΔH [J/g]	T_{max} [°C]	T_{onset} [°C]
0	-129,3	184,4	183,3
25	-127,2	183,7	181,5
50	-119,2	183,0	181,0
100	-111,3	182,7	180,7
200	-101,4	181,5	179,5

A.



B.

Ryc. 31. Zależności T_{max} , T_{onset} (A) i ΔH (B) od dawki promieniowania dla MK

Podsumowując ten etap badań należy zauważyć, że analiza DSC jest cennym narzędziem przydatnym do wstępnego określania czystości pochodnych azolu. Obniżenie temperatury topnienia, niezależnie czy porównamy wartości T_{onset} (tzn. temperaturę początku piku topnienia) czy T_{max} (maksimum piku topnienia) wskazuje na obecność zanieczyszczeń we wszystkich czterech związkach po napromieniowaniu.

Dla FK i MK, czyli pochodnych gdzie obniżenie temperatury topnienia było w granicach 2-4°C można postawić tezę, iż obniżenie tej wartości jest wprost proporcjonalne do wzrostu dawki promieniowania jonizującego, oczywiście, aby to potwierdzić należałoby wykonać badania dla większego zakresu dawek, wtedy też można by rozstrzygnąć, czy entalpia procesu jest skorelowana z dawką promieniowania jak to sygnalizują wyniki otrzymane dla FK i MK.

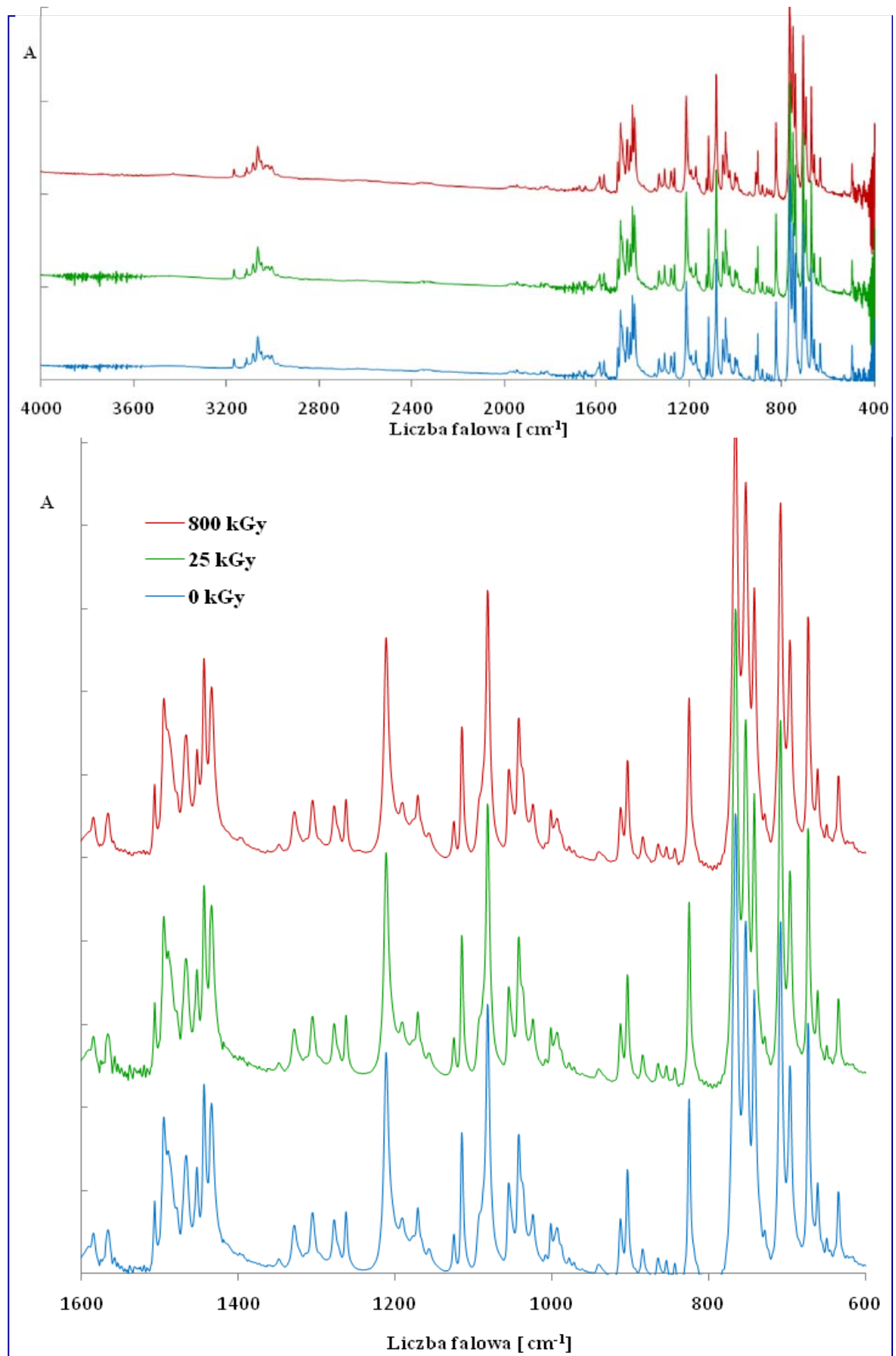
4.6.1.6. Spektrofotometria w podczerwieni (FT-IR)

Analizę spektroskopową w podczerwieni (FT-IR) przeprowadzono zgodnie z metodyką zamieszczoną w rozdziale 4.5.4. dla nienapromieniowanych pochodnych azolu oraz dla napromieniowanych dawkami: 25 i 200 kGy FK, 25 i 400 kGy dla CK, MK; oraz 25 i 800 kGy dla CK.

We wszystkich przypadkach widma związków wybranych do badań były zgodne z danymi literaturowymi [138]. Porównując widma FT-IR związków przed i po napromieniowaniu nie obserwowano zmian w ich przebiegu, jedynie w niewielkie zmiany intensywności widm, które mogły wynikać z różnic odważek.

Ryc. 32. przedstawia wynik analizy dla CK.

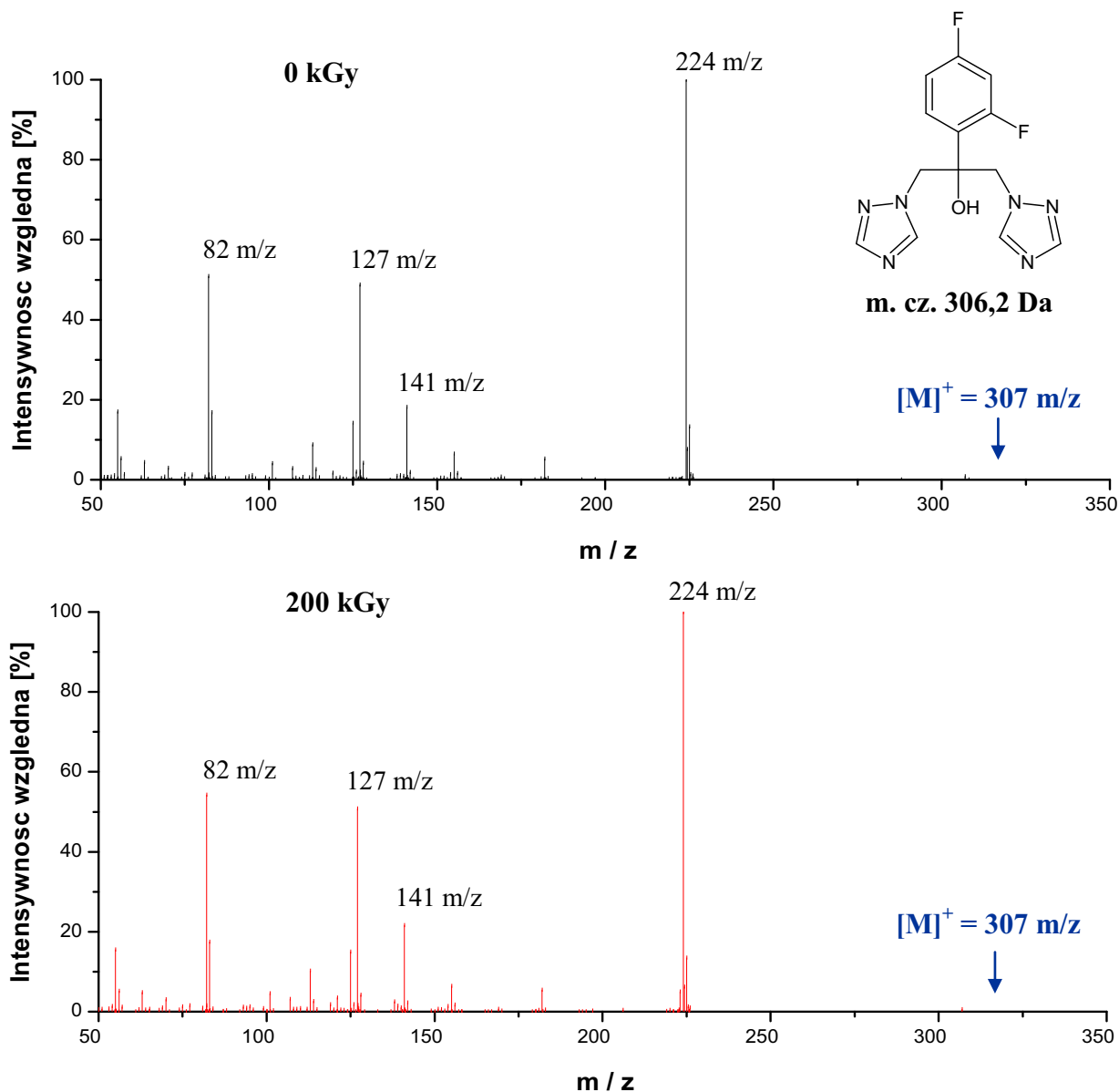
Wyniki analizy FT-IR potwierdzają wnioski postawione już na podstawie analizy organoleptycznej, iż prawdopodobnie zawartość produktów radiodegradacji jest poniżej 3-5%. Taka niewielka ilość produktów rozkładu radiolitycznego o prawdopodobnie bardzo zbliżonej budowie do związku macierzystego, uniemożliwia wykrycie zmian metodą spektrofotometrii w podczerwieni.



Ryc. 32. Widma FT-IR dla CK przed i po napromieniowaniu

4.6.1.7. Spektrometria mas (MS)

Analizę MS wykonano zgodnie z metodyką opisaną w rozdziale 4.5.6., dla nienapromieniowanych pochodnych azolu, jak również dla napromieniowanych dawką 200 kGy. Otrzymane widma EI-MS związków przedstawiono na Rys. 33, 35, 37 i 39. Najważniejsze parametry widm zestawiono w Tabelach 13-16, a proponowane struktury jonów fragmentacyjnych zilustrowano na Ryc. 34, 36, 38 i 40.



Ryc. 33. Widma mas dla FK przed i po napromieniowaniu

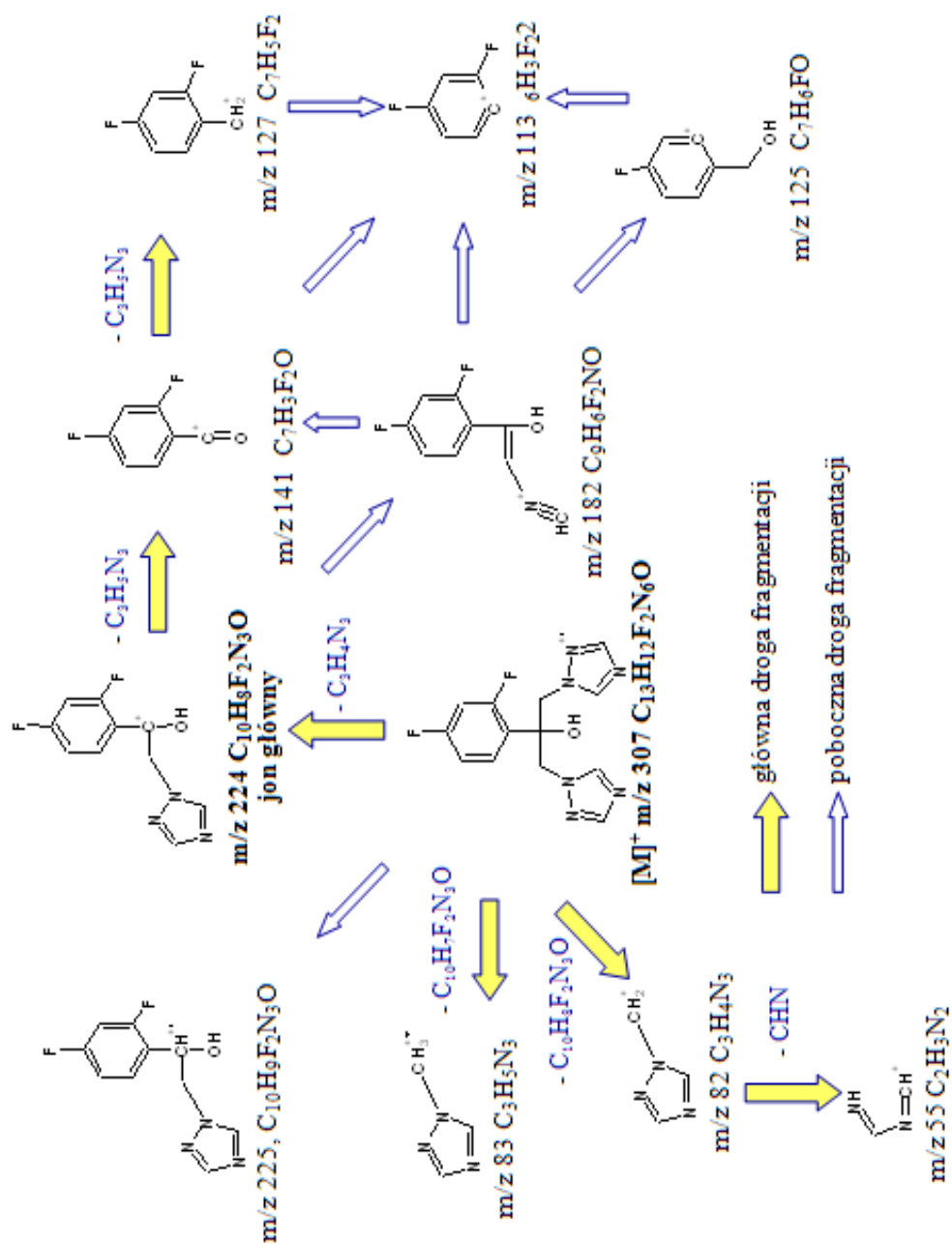
Tabela 13. Najintensywniejsze jony widma mas dla FK

Lp.	0 kGy		200 kGy
	m/z	int. wzgl. [%]	Δ int. wzgl. [%]*
jon główny	224	100,00	0,00
1	82	50,90	+3,35
2	127	48,83	+2,02
3	141	18,25	+3,38
4	55	17,04	-1,48
5	83	16,87	+0,66
6	125	14,21	+0,81
7	225	13,31	+0,24
8	113	8,86	+1,36
9	224	7,68	-1,43
10	155	6,51	-0,09
11	56	5,38	-0,16
12	182	5,31	+0,13
13	63	4,43	+0,41
14	128	4,25	-0,40
jon molekularny	307	0,91	-0,28

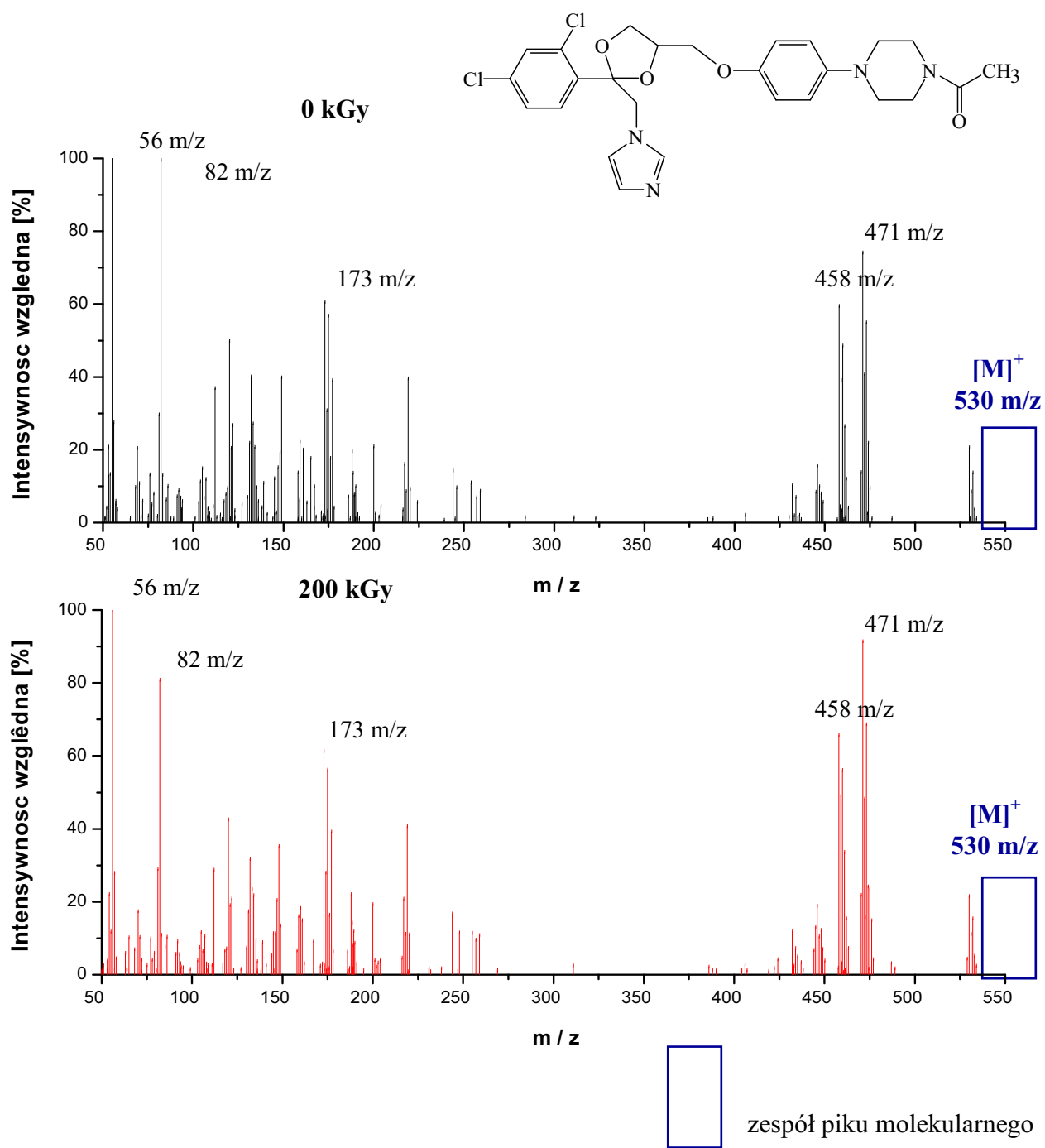
$$*\Delta \text{ int. wzgl.} = \text{int. wzgl.}_{200 \text{ kGy}} - \text{int. wzgl.}_{0 \text{ kGy}}$$

W wykonanym widmie mas jon molekularny flukonazolu posiada wartość $m/z = 307$, jest to o 0,63 więcej niż wynosi masa atomowa tego związku, co można tłumaczyć przyjmowaniem protonu przez z fluor (centrum elektroujemności cząsteczki), lub odchyleniami izotopowymi, gdyż wartość masy cząsteczkowej 306,27 jest wartością uśrednioną.

Na Ryc. 34. przedstawiono struktury jonów fragmentacyjnych FK.



Ryc. 34. Proponowane drogi fragmentacji FK



Ryc. 35. Widma mas dla KK przed i po napromieniowaniu

Tabela 14. Najintensywniejsze jony widma mas KK

Lp.	0 kGy		200 kGy
	m/z	int. wzgl. [%]	Δ int. wzgl. [%]*
jon główny	56	100,00	0,00
1	82	99,71	-18,79
2	471	74,22	+17,21
3	173	60,62	-4,40
4	458	59,54	+6,25
5	175	56,82	+4,54
6	473	55,03	+13,64
7	120	50,01	-7,38
8	460	48,71	+7,43
9	472	40,51	+7,74
10	132	40,12	-9,72
11	149	39,91	-7,63
12	219	39,59	+1,18
13	459	39,24	+9,88
14	177	39,13	+0,09
jon molekularny	530	20,65	+0,87
	532	13,81	+0,57
	534	1,80	+0,75

* Δ int. wzgl. = int. wzgl._{200 kGy} - int. wzgl._{0 kGy}

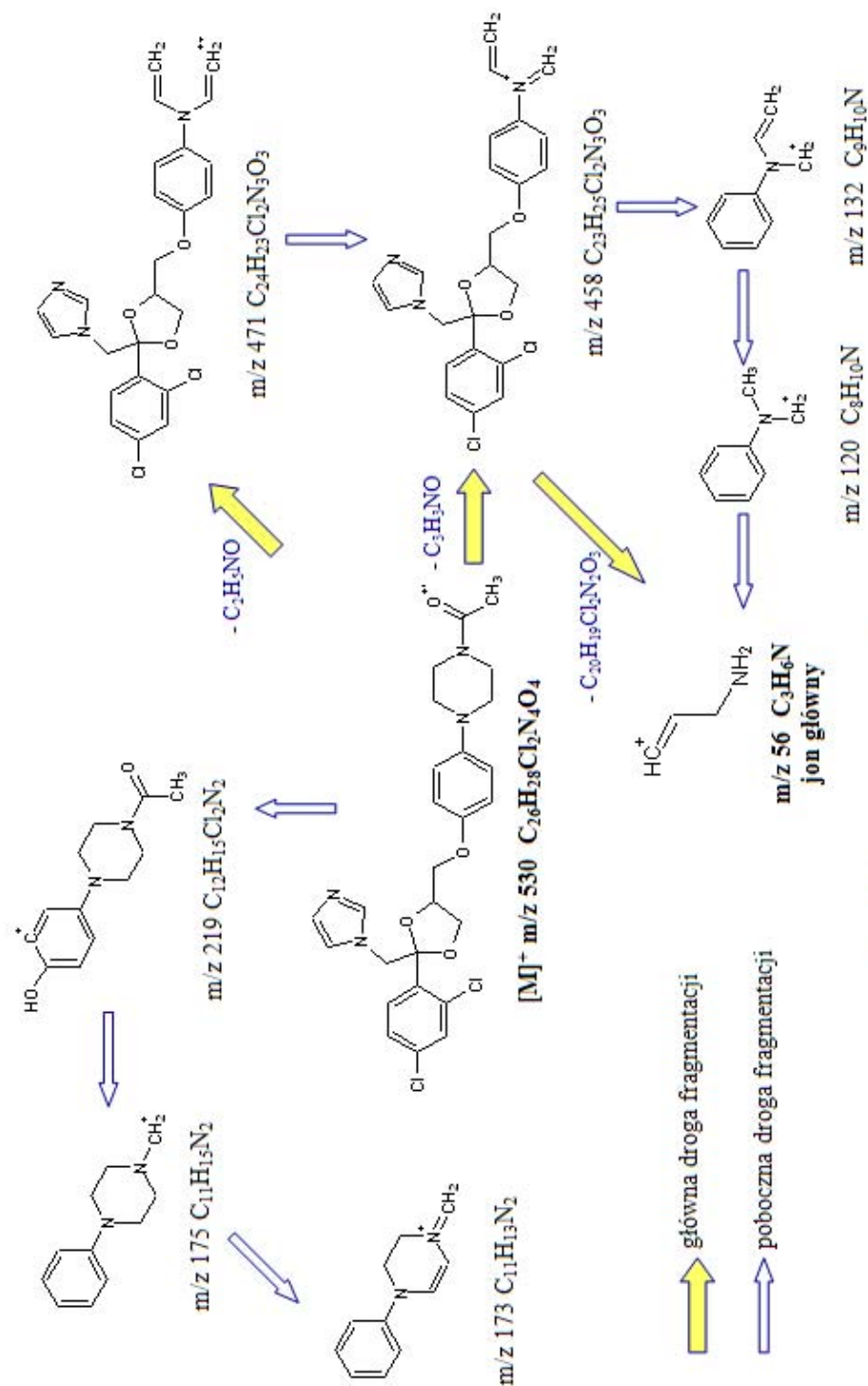
Obecność dwóch atomów chloru w cząsteczce ketokonazolu odpowiada za charakterystyczny zespół piku molekularnego. Izotopy chloru powodują w tym przypadku powstawanie jonów o masach:

$$x + 35 + 35 = M$$

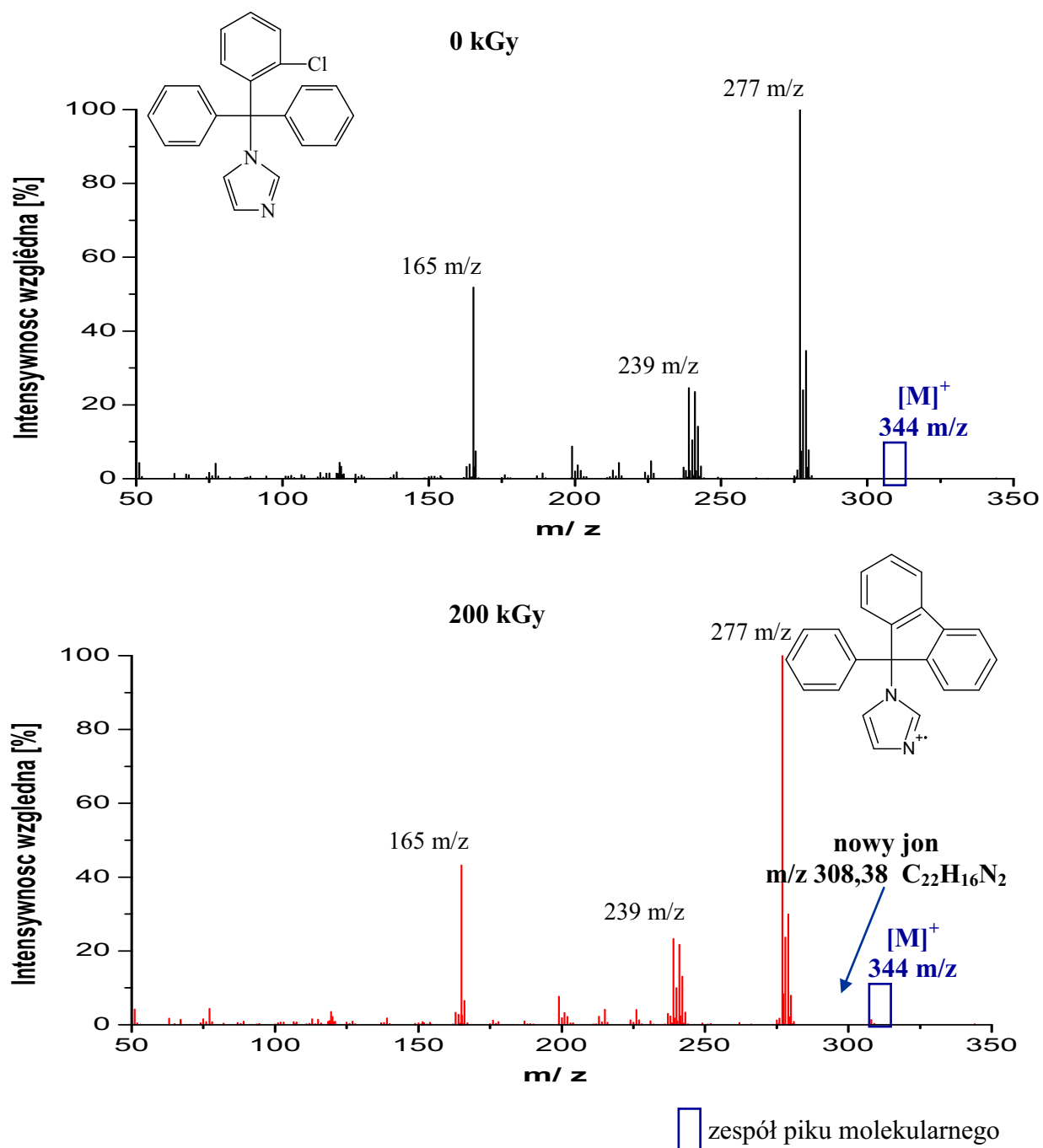
$$x + 35 + 37 = M + 2$$

$$x + 37 + 37 = M + 4$$

Stosunek intensywności tych jonów wynosi 9:6:1. W widmie ketokonazolu zespół piku molekularnego zawiera jony o m/z 530, 532 i 534 [139].



Ryc. 36. Proponowane drogi fragmentacji KK



Ryc. 37. Widma mas dla CK przed i po napromieniowaniu

Tabela 15. Najintensywniejsze jony widma mas CK

Lp.	0 kGy		200 kGy
	m/z	int. wzgl. [%]	Δ int. wzgl. [%]*
jon główny	277	51,91	+0,00
1	165	34,75	-8,64
2	279	24,62	-4,70
3	239	24,12	-1,28
4	278	23,62	-0,38
5	241	14,24	-1,88
6	242	10,56	-1,07
7	240	8,84	-0,52
8	199	7,82	-1,11
9	280	7,59	+0,20
10	166	7,52	-0,92
11	277	4,83	+0,90
12	226	4,45	-0,82
13	119	4,40	-0,56
14	51	0,15	-0,48
jon molekularny	344	0,15	+0,06
najważniejszy nowy jon			308 1,40

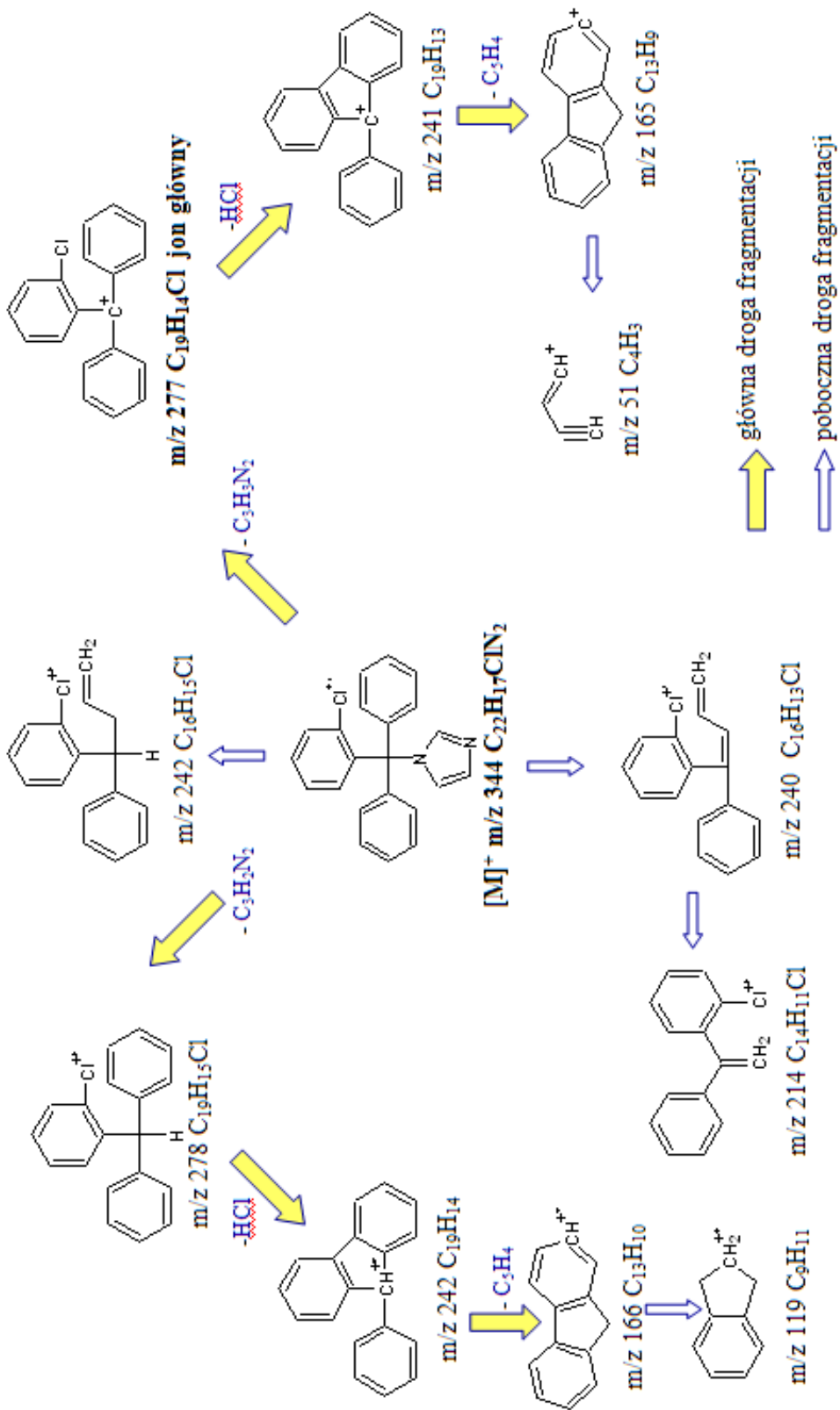
* Δ int. wzgl. = int. wzgl._{200 kGy} - int. wzgl._{0 kGy}

Obecność atomu chloru w cząsteczce klotrymazolu powoduje pojawienie się charakterystycznych pików izotopowych w widmie mas tego związku. Chlor bowiem występuje w przyrodzie w postaci dwóch izotopów ^{35}Cl (75,77%) i ^{37}Cl (24,23%), odpowiadają one za powstawanie jonów o masach:

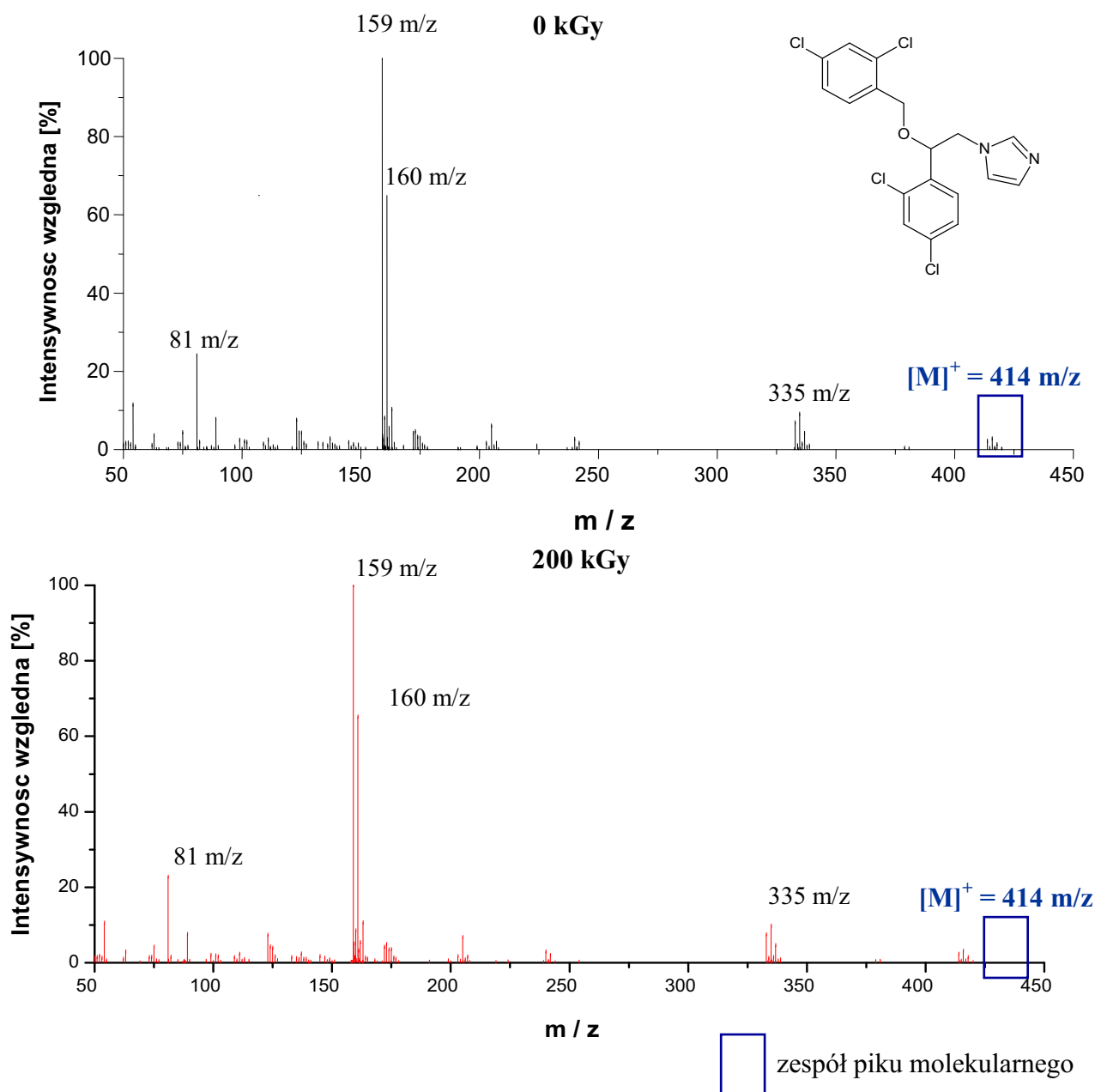
$$x + 35 = M$$

$$x + 37 = M + 2$$

Stosunek intensywności tych jonów wynosi 3:1. Ze względu na niską intensywność jonu molekularnego w widmie nie zaobserwowano takiej prawidłowości, lecz już w zespole pików głównego o m/z 277 znajduje się pik izotopowy o m/z 279 i intensywności około 3 razy niższej niż jon główny [139].



Ryc. 38. Proponowane drogi fragmentacji CK



Ryc. 39. Widma mas dla MK przed i po napromieniowaniu

W cząsteczce mikonazolu występują aż 4 atomy chloru, dlatego zespół pików molekularnego zawierać może wiele pików izotopowych, tak jak to ma miejsce dla tetrachlorometanu (CCl_4), gdzie uwzględniając możliwe kombinacje izotopów chloru otrzymujemy:

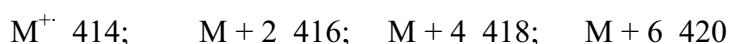
M^+	$C^{35}Cl^{35}Cl^{35}Cl^{35}Cl$	$m/z= 152$, int. wzgl. = 77,17%
$M + 2$	$C^{35}Cl^{35}Cl^{35}Cl^{37}Cl$	$m/z= 154$, int. wzgl. = 100,00%
$M + 4$	$C^{35}Cl^{35}Cl^{35}Cl^{35}Cl$	$m/z= 156$, int. wzgl. = 48,60%
$M + 6$	$C^{35}Cl^{35}Cl^{35}Cl^{35}Cl$	$m/z= 158$, int. wzgl. = 10,50%
$M + 8$	$C^{35}Cl^{35}Cl^{35}Cl^{35}Cl$	$m/z= 160$, int. wzgl. = 0,85%

Tabela 16. Najintensywniejsze jony widma mas MK

Lp.	0 kGy		200 kGy
	m/z	int. wzgl. [%]	Δ int. wzgl. [%]*
jon główny	159	100,00	0,00
1	160	65,28	-0,40
2	81	22,83	+1,20
3	163	10,70	+0,82
4	54	10,59	-0,25
5	335	9,83	-0,73
6	160	8,55	-0,42
7	89	7,61	+0,19
8	333	7,54	+0,09
9	123	7,40	-0,48
10	205	6,81	-0,73
11	162	5,45	+0,04
12	159	5,11	-0,44
13	173	4,98	-0,57
14	334	4,70	-0,34
jon molekularny	414	2,18	+0,22
	416	2,86	+0,31
	418	1,33	+0,18
	420	0,14	+0,03

* Δ int. wzgl. = int. wzgl._{200 kGy} - int. wzgl._{0 kGy}

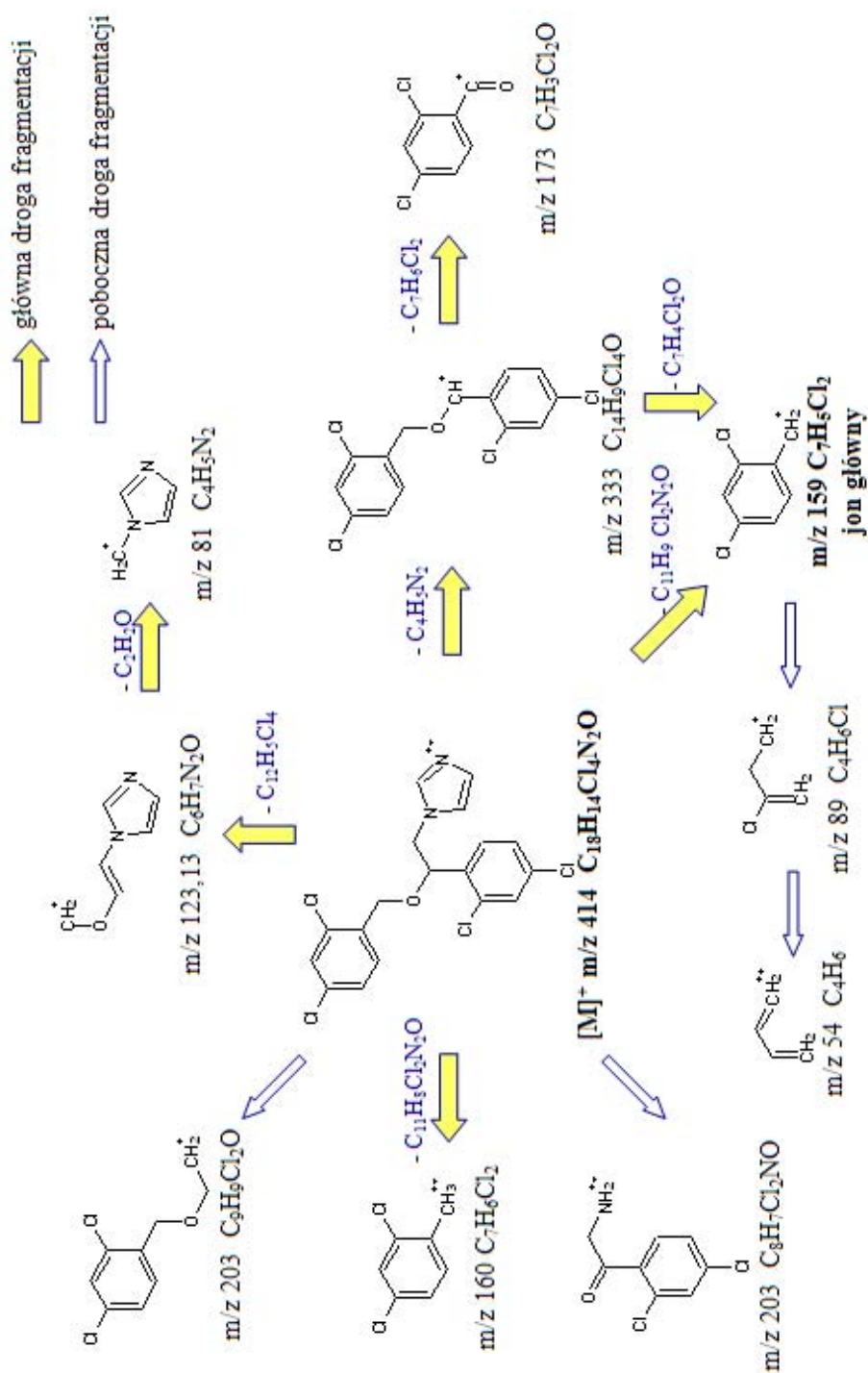
Dla zespołu jonu molekularnego MK stosunki m/z wynoszą odpowiednio:



jon M+8 ze względu na niską intensywność względną (< 0,1%) nie jest obserwowany.

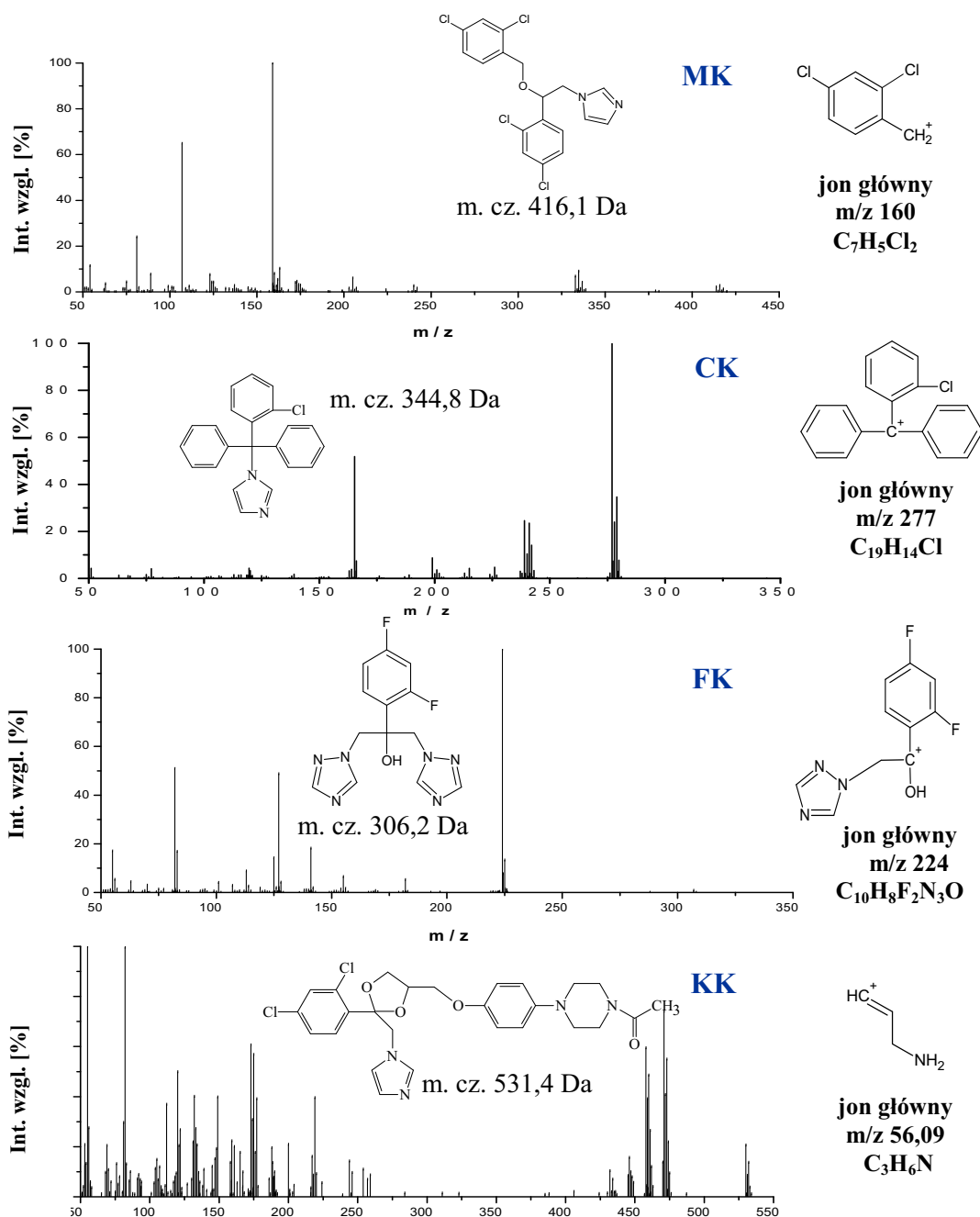
Ten charakterystyczny układ obserwujemy dla jonu fragmentacyjnego m/z = 333 (i.w.= 6,92%), gdzie jon izotopowy M+2 obserwujemy jako m/z = 335 (i.w. 9,10%), M+4 jako m/z 337 (i.w. 4,25%) oraz M+6 to m/z=339 (i.w. 0,97%). Dlatego też struktura dopasowana do m/z= 333 (m/z po uśrednieniu mas izotopów) zawiera 4 atomy chloru. Natomiast analiza intensywności jonu głównego o m/z 159 oraz jonu izotopowego o m/z 161 musi odpowiadać strukturze zawierającej 2 atomy tego pierwiastka.

Chociaż badany związek jest azotanem, podczas analizy EI-MS obserwujemy tylko jony mikonazolu, cząsteczka azotanu rozpada się niezależnie od kationu [139].



Ryc. 40. Proponowane drogi fragmentacji MK

Otrzymane widma mas badanych pochodnych azolu były zgodne z danymi literaturowymi [138]. Zestawienie tych widm podkreśla różnice w budowie tych związków (Ryc. 41.).


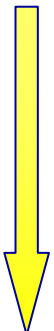
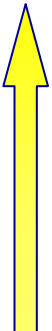


Ryc. 41. Porównanie widm mas badanych pochodnych azolu

Największą cząsteczką (531,4 Da), a co za tym idzie najbardziej skomplikowaną budową charakteryzuje się KK, jego fragmentacja przebiega najszybciej o czym może świadczyć niska wartość m/z jonu głównego (56,09, stanowi to 10,6% masy cząsteczkowej). MK ma nieco niższą masę cząsteczkową tj. 416,1 Da (479,1 Da w formie azotanu) w tym przypadku

jon główny charakteryzuje się m/z 160,02 (38,5% masy cząsteczkowej). Mniejszymi cząsteczkami charakteryzuje się CK zawierający w swej strukturze 3 pierścienie benzenowe i jeden imidazolowy (344,8 Da) oraz FK z jednym pierścieniem benzenowym i dwoma triazolowymi (306,2), w tych przypadkach rozpad w standardowych warunkach badania EI-MS był łagodniejszy, najintensywniejsze jony widma miały wartości m/z odpowiednio dla CK 227,77 (66,1% masy cząsteczkowej) i FK 224,19 (73,2%). FK i CK charakteryzują się bardzo niską intensywnością jonu molekularnego, odpowiednio 0,91 i 0,15% intensywności względnej. Powyższe parametry zebrano w tabeli 15.

Tabela 17. Parametry widm mas badanych pochodnych azolu

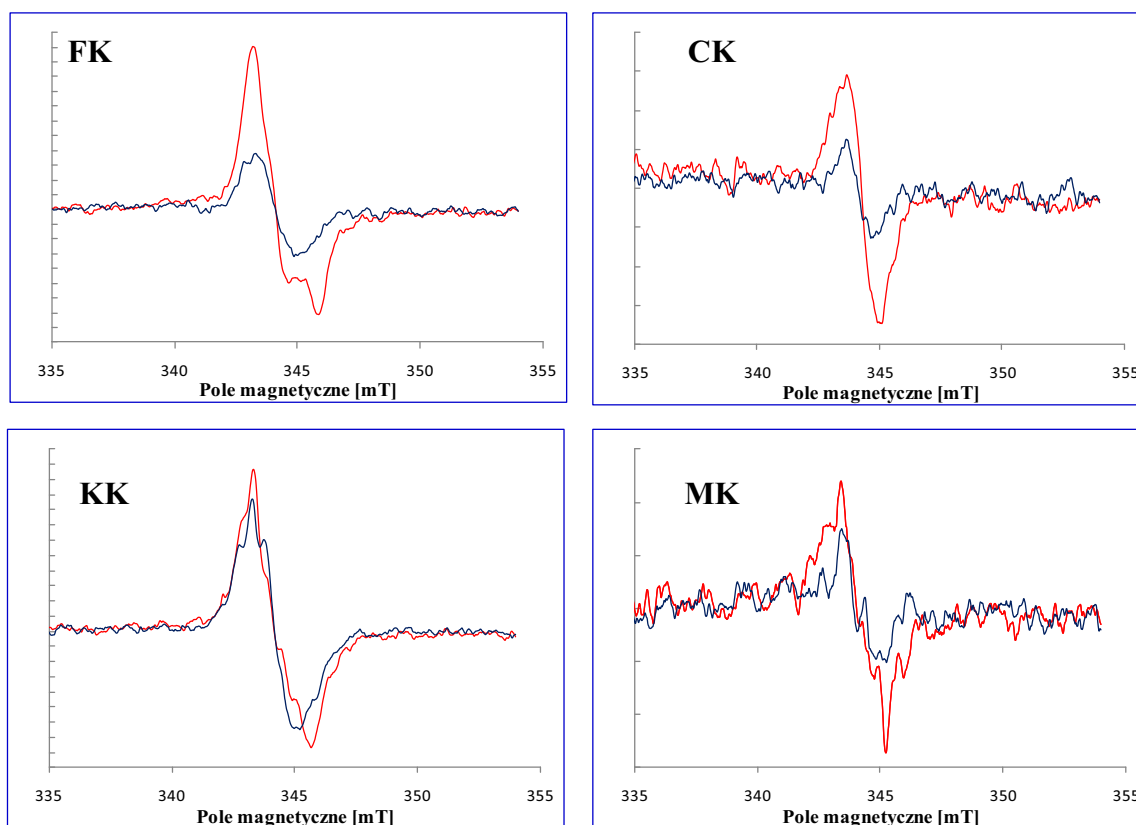
Symbol związku	Masa cząsteczkowa [Da]	[M] ⁺				Jon główny	
		m/z		int. wzgl. [%]		m/z	
FK	306,2	307		0,91		224	
CK	344,8	344		0,15		277	
MK	479,1 [*]	414		2,18		159	
	416,1 ^{**}			20,65		56	

^{*} azotan mikonazolu ^{**} mikonazol

Z przedstawionych rezultatów badań wynika, że badane związki nie mają podobnych dróg fragmentacji, ponieważ ich struktury znacznie się różnią. Zaobserwowano jedynie prawidłowość, że im większa cząsteczka związku tym bogatsze jej widmo masowe, a jon główny widma posiada niższą wartość m/z .

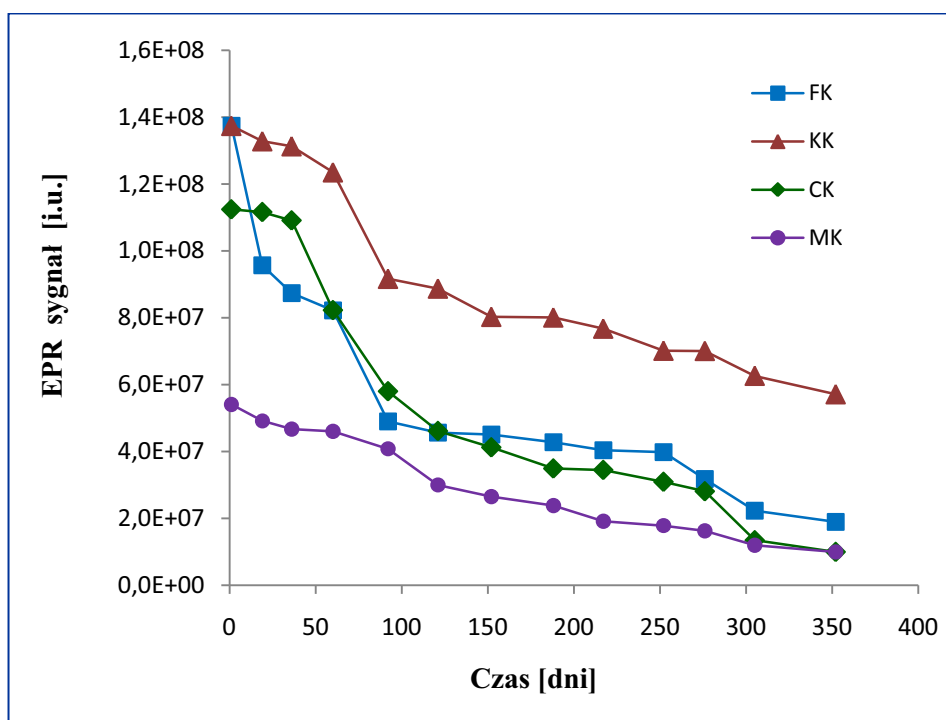
4.6.1.8. Analiza metodą EPR

Wyniki analizy elektronowego rezonansu paramagnetycznego pozwalają na stwierdzenie obecności cząstek z niesparowanym elektronem, czyli wolnych rodników. Próbki związków wyjściowych nie posiadały widma EPR (linia prosta), czyli nie zawierały wolnych rodników, natomiast w próbkach pochodnych azolu napromieniowanych w stanie stałym stwierdzono ich obecność. Widma EPR badanych pochodnych azolu po 1 dniu i po 352 dniach od napromieniowania przedstawiono na Ryc. 42.



Ryc. 42. Widma EPR badanych związków po napromieniowaniu dawką 25 kGy
– po upływie 1 dnia od napromieniowania, – po roku od napromieniowania

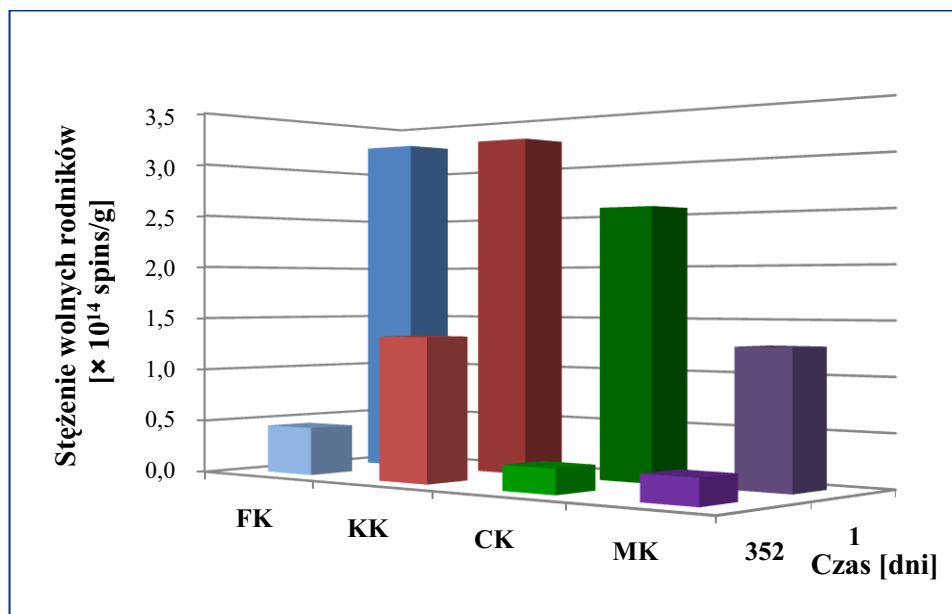
Natomiast na Ryc. 43 i 44 przedstawiono wartości szczegółowych pomiarów wykonywanych w okresie jednego roku.



Ryc. 43. Czas życia wolnych rodników powstałych po napromieniowaniu badanych azoli dawką 25 kGy

W badanej grupie związków ilość powstałych wolnych rodników oraz czas ich życia jest zróżnicowany. Najwyższe stężenia wolnych rodników odnotowano dla flukonazolu i ketokonazolu, nieco niższe dla klotrymazolu, a najniższe dla azotanu mikonazolu. Choć ketokonazol i flukonazol miały ten sam wynik pomiaru tuż po napromieniowaniu ($3,23 \times 10^{14}$ spin/g) po upływie roku odpowiadające wyniki nie były zbliżone. We flukonazolu zachowało się około 3 razy mniej wolnych rodników (tj. $4,5 \times 10^{13}$ spin/g) niż w ketokonazolu ($1,34 \times 10^{14}$ spin/g). Może to oznaczać, że wolne rodniki ketokonazolu są bardziej trwałe lub że rekombinacja zachodzi wolnie, może się to wiązać także z większą masą cząsteczki i ilością atomów tlenu i azotu z wolnymi parami elektronowymi w cząsteczce ketokonazolu. Z rycin wynika, iż stężenie wolnych rodników w próbce ketokonazolu po roku od napromieniowania było o około 5 % wyższe od stężenia wolnych rodników w azotanie mikonazolu tuż po napromieniowaniu ($1,27 \times 10^{14}$ spin/g) - Ryc. 43 i 44.

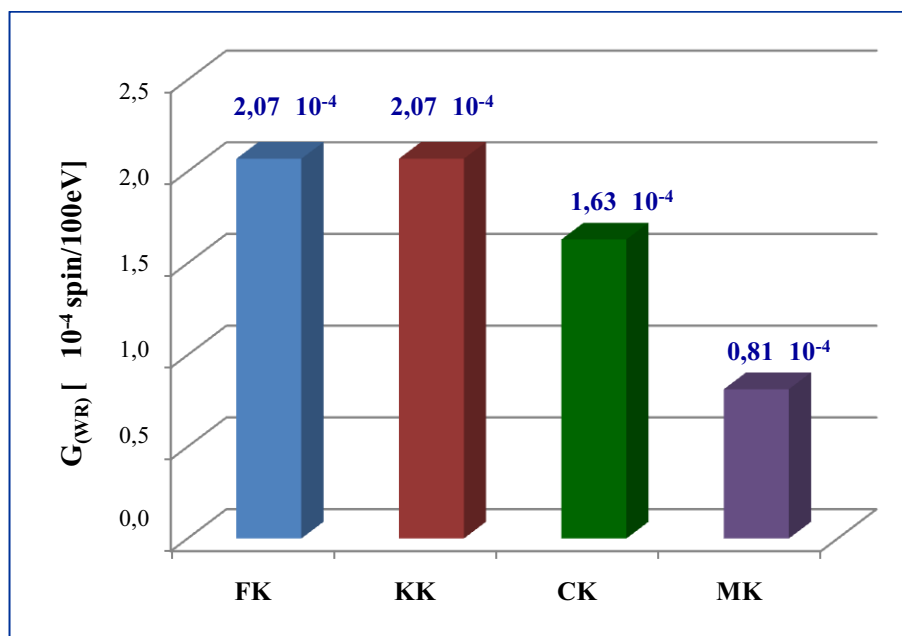
Na podstawie analizy wykresu przedstawiającego czas życia wolnych rodników (Ryc. 43.) można też stwierdzić, że spadek zawartości wolnych rodników jest najszybszy w przypadku FK, a najwolniejszy dla MK.



Ryc. 44. Stężenie wolnych rodników w próbkach azoli napromieniowanych dawką 25 kGy oraz po 352 dniach przechowywania

Poznanie struktur wolnych rodników jest niestety skomplikowane i wymagałoby dalszych badań, do których potrzebne byłyby większe ilości badanych związków.

Wartości wydajności radiolitycznej G_{WR} mieszczą się w zakresie od $2,07 \times 10^{-4}$ spin/100 eV (dla FK i KK) do $0,81 \times 10^{-4}$ spin/100 eV (dla MK) – Ryc. 45.



Ryc. 45. Wydajność radiolityczna tworzenia się wolnych rodników podczas napromieniowania badanych związków dawką 25 kGy

4.6.2. Metody pośrednie

4.6.2.1. Wyniki pomiarów pH

W Tabeli 18. zestawiono wyniki pomiarów pH flukonazolu. Inne pochodne nie były badane ze względu na słabą lub bardzo słabą rozpuszczalność w wodzie.

Tabela 18. Pomiar pH roztworów FK przed i po napromieniowaniu

Dawka [kGy]	pH	Różnica	
		[jednostki pH]	[%]
0	6,48	-	-
25	6,45	-0,03	-0,46
100	6,13	-0,35	-5,40
400	5,51	-0,97	-14,99

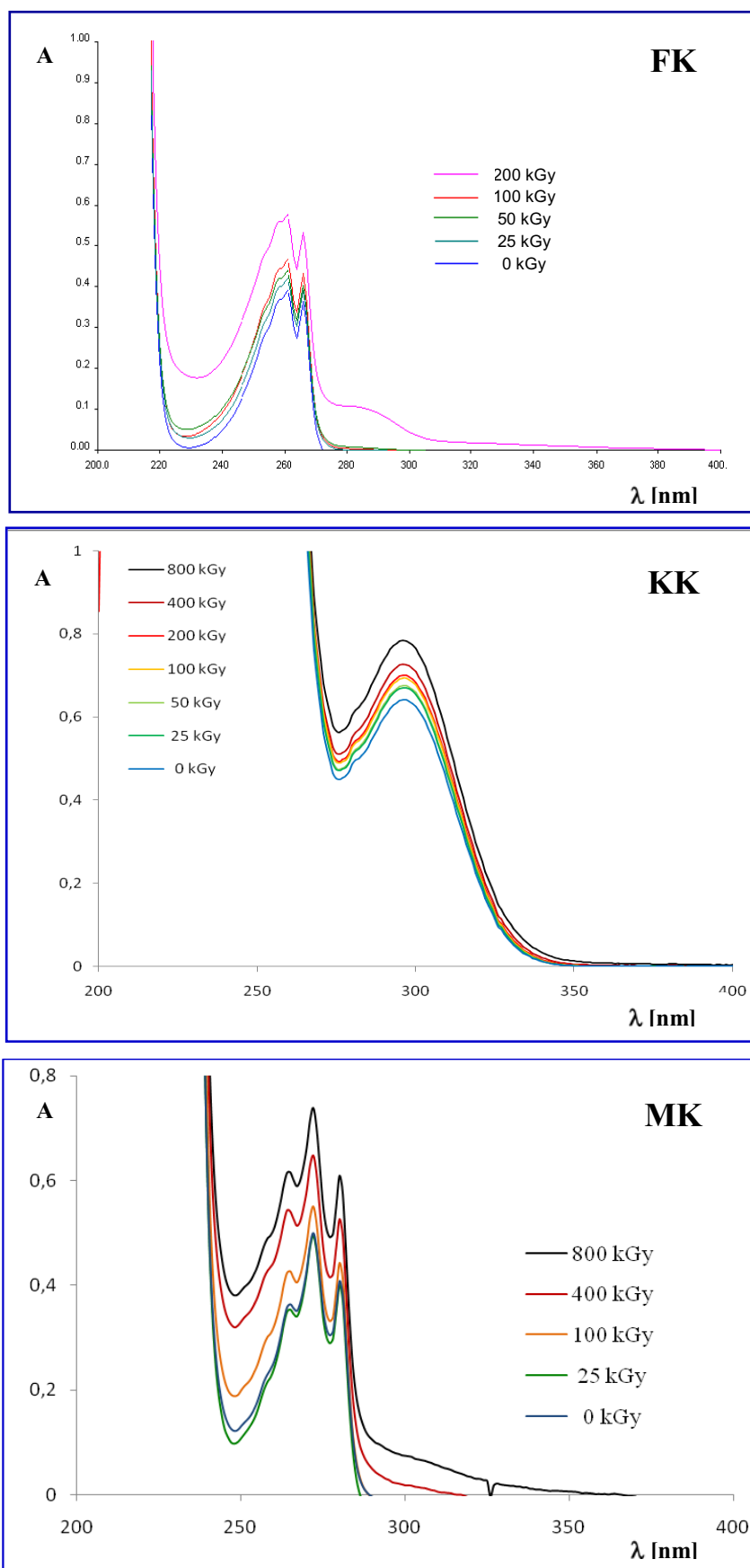
Tak wyraźny spadek pH wodnych roztworów FK po napromieniowaniu wskazuje na powstawanie produktów rozkładu o charakterze kwasowym.

4.6.2.2. Analiza spektrofotometryczna w nadfiolecie (UV)

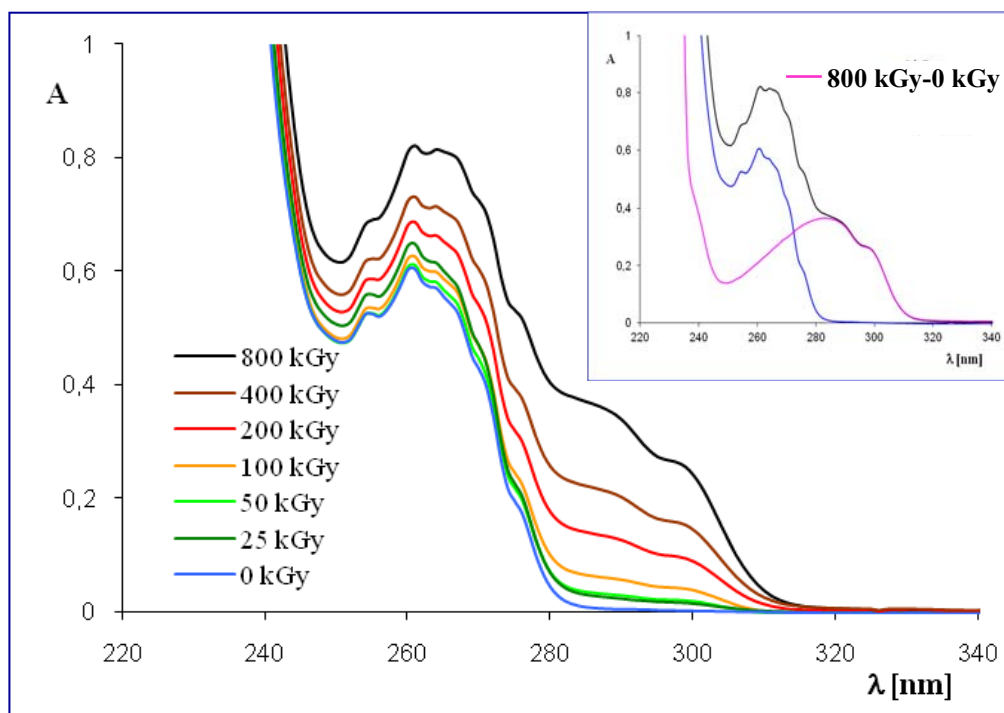
Analizę spektrofotometryczną w UV przeprowadzono zgodnie z metodyką zamieszczoną w rozdziale 4.5.9. Pomiarów absorbancji dokonano przy analitycznych długościach fali wobec metanolu (lub wody w przypadku FK) jako próby odniesienia, zarówno dla związków wyjściowych jak i poddanych napromieniowaniu.

Widma UV napromieniowanych pochodnych azolu wykazały następujące zmiany (Ryc. 46):

- FK wzrost absorbancji w zakresie 220-350 nm, a w dawkach > 200kGy dodatkowe pasmo absorpcji w zakresie 280-320 nm,
- KK wzrost absorbancji w zakresie 260-350 nm,
- CK wzrost absorbancji w zakresie 250-320 nm, szczególnie obserwowany w zakresie 280-320 nm, gdyż wyjściowy związek nie absorbuje promieniowania ultrafioletowego w tym zakresie (Ryc. 47)
- MK wzrost absorbancji w zakresie 240-350 nm.

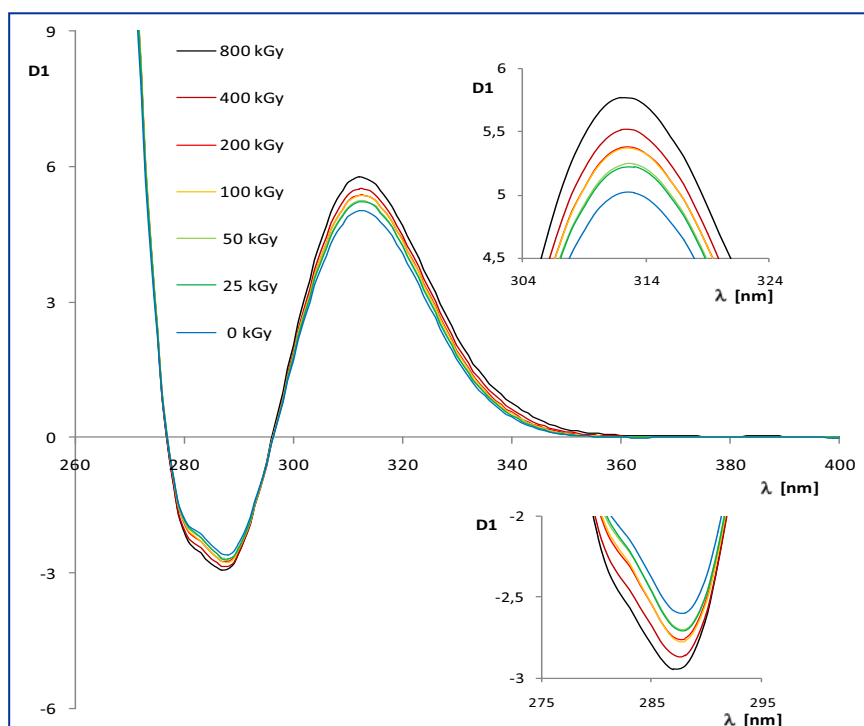


Ryc. 46. Widma UV 0,02% roztworów FK (H₂O) oraz KK i MK (CH₃OH) przed i po napromieniowaniu



Ryc. 47. Widma UV dla CK przed i po napromieniowaniu (0,03%, CH₃OH)

Wykreślono także dla KK i CK I i II pochodne widm. W przypadku KK zmiany po napromieniowaniu były analogiczne do zmian obserwowanych w przebiegu widma UV zerowego rzędu, stwierdzono wzrost amplitudy przebiegu funkcji $D1 = f(\lambda)$, tj. wzrost intensywności widma w maksimum i spadek intensywności w minimum – Ryc. 48.



Ryc. 48. Pierwsza pochodna widm UV dla KK przed i po napromieniowaniu

W przypadku CK stwierdzono pojawienie się nowych maksimumów, szczególnie przydatne wydaje się maksimum pierwszej pochodnej widma przy $\lambda = 308$ nm, a jego monitorowanie może być bardzo czułym narzędziem do wykrywania zmian po napromieniowaniu (Tabela 19., Ryc. 49.).

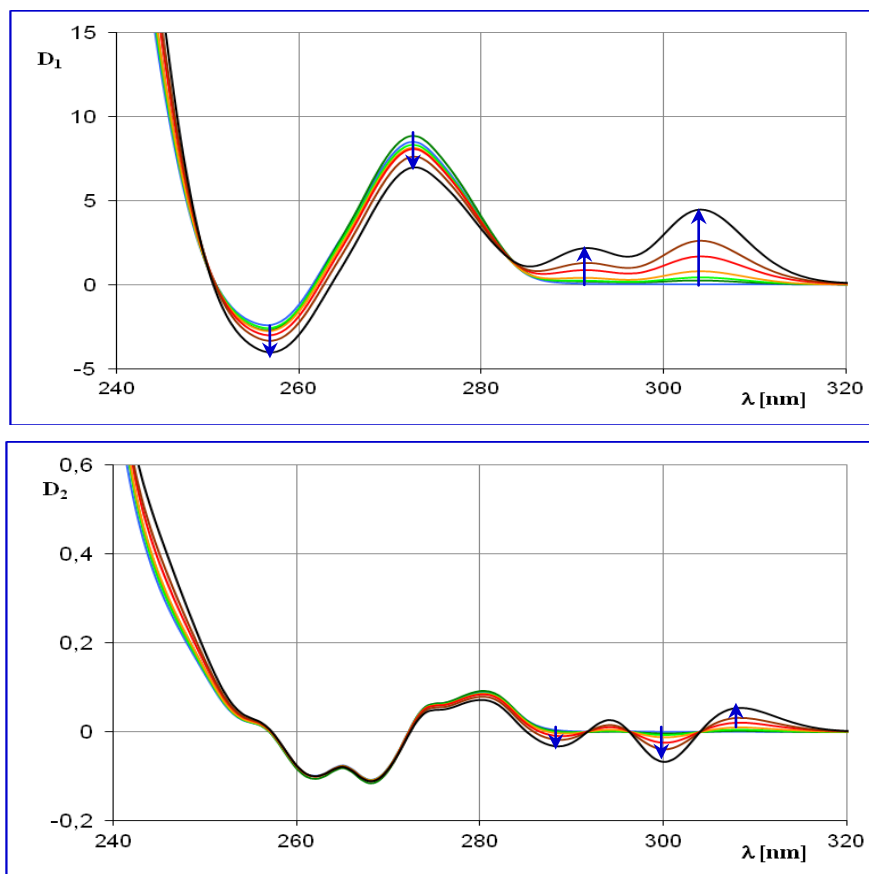
Tabela 19. Zmiany w przebiegu widm absorpcji oraz I i II pochodnej widm UV dla CK po napromieniowaniu

Dawka		Absorbancja A	Pierwsza pochodna widma D ₁ *			Druga pochodna widma D ₂ *			
		261 nm max	272 nm max	292 nm max	304 nm max	262 nm min	280 nm max	300 nm min	308 nm max
Różnica [%]	$\Delta_{25\text{kGy}-0\text{kGy}}$	7,46	4,10	196,2	573,2	6,06	4,494	4900	1264
	$\Delta_{50\text{kGy}-0\text{kGy}}$	1,82	-2,38	244,2	1904,9	1,01	-1,127	9900	2173
	$\Delta_{100\text{kGy}-0\text{kGy}}$	3,81	-4,27	502,0	3982,99	1,01	-3,371	19900	4445
	$\Delta_{200\text{kGy}-0\text{kGy}}$	13,76	-5,66	1110,5	6290,2	1,01	-5,618	41567	9445
	$\Delta_{400\text{kGy}-0\text{kGy}}$	21,39	-10,84	1750,0	10853,7	1,01	-10,112	64900	14445
	$\Delta_{800\text{kGy}-0\text{kGy}}$	36,32	-18,32	3027,0	10753,7	0,00	-17,978	111567	24900

* wyznaczone metodą "peak-zero"

Podsumowując, wszystkie pochodne azolu po napromieniowaniu wykazują wzrost absorpcji promieniowania nadfioletowego, szczególnie przy analitycznych długościach fal (Tabela 19), a największy odnotowano dla MK +69,42% przy dawce 800 kGy. Jedynie dla MK orze dawce 25 kGy obserwowano nieznacznie obniżenie absorpcji (od 0,81 do 2,45%).

Także nowe pasma absorpcji są pośrednim dowodem na obecność produktów radiolizy pochodnych azolu. Wzrost absorpcji przy analitycznej długości fali świadczy o produktach radiolizy z chromoforem zbliżonym do chromoforu związków macierzystych, o podobnej lub silniejszej absorpcji promieni UV. W przypadku KK maksimum absorpcji UV produktów jego radiolizy jest dokładnie w zakresie maksimum związku wyjściowego, a dla FK, CK i MK λ_{max} ich produktów radiolizy jest przesunięte w kierunku fal dłuższych względem λ_{max} związków wyjściowych. Najwyraźniej obserwowano pojawienie się dodatkowego pasma absorpcji w próbkach CK po napromieniowaniu. Różnica widm CK przed i po napromieniowaniu dawką 400 kGy posiada maksimum $\lambda = 283$ nm, a pierwsza pochodna tychże widm wykazuje dodatkowe maksimum przy $\lambda = 308$ nm.



Ryc. 49. Pierwsza i druga pochodna widm UV dla CK przed i po napromieniowaniu (kierunek zmian po napromieniowaniu zaznaczono strzałkami)

W przypadku trzech pochodnych azolu KK, CK i MK stwierdzono, że wzrost absorbancji po napromieniowaniu jest wprost proporcjonalny do dawki promieniowania jonizującego – Tabela 20.

Tabela 20. Zmiany absorbancji widm UV pochodnych azolu po napromieniowaniu

Dawka promieniowania [kGy]	Zmiana absorbancji po napromieniowaniu [%]					
	FK	KK	CK	MK		
	261 nm	296 nm	261 nm	265 nm	272 nm	280 nm
25	+4,90	+ 4,53	+ 7,46	- 2,45	- 0,805	- 1,72
100	+4,14	+ 8,12	+ 3,81	+17,63	+ 10,42	+ 22,04
400	+37,91*	+ 13,22	+ 21,39	+48,76	+ 29,66	+ 44,63
800	-	+ 22,06	+ 36,32	+ 69,42	+ 47,90	+ 67,77
$A = f(\text{dawki})$ $y = a \cdot x + b$	-	$a=2,00 \cdot 10^{-4}$ $b=0,6636$	$a=3,00 \cdot 10^{-4}$ $b=0,583$	$a=3,05 \cdot 10^{-4}$ $b=0,505$	$a=2,61 \cdot 10^{-4}$ $b=0,408$	$a=3,27 \cdot 10^{-4}$ $b=0,373$
r ($n=7$)	-	0,9690	0,9806	0,9873	0,9919	0,9709

*200 kGy

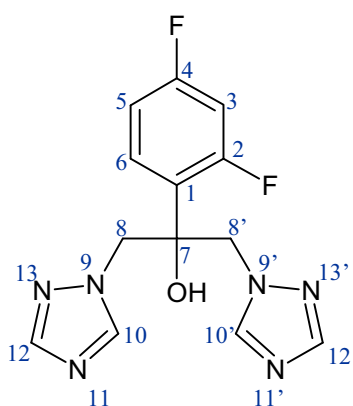
4.6.2.3. Analiza metodą NMR

Badania metodą $^1\text{H-NMR}$ oraz $^{13}\text{C-NMR}$ wykonano zgodnie z metodyką opisaną w punkcie 4.5.6. Uzyskane wyniki przedstawiono na Ryc. 50-53 oraz w Tabelach 21-28.

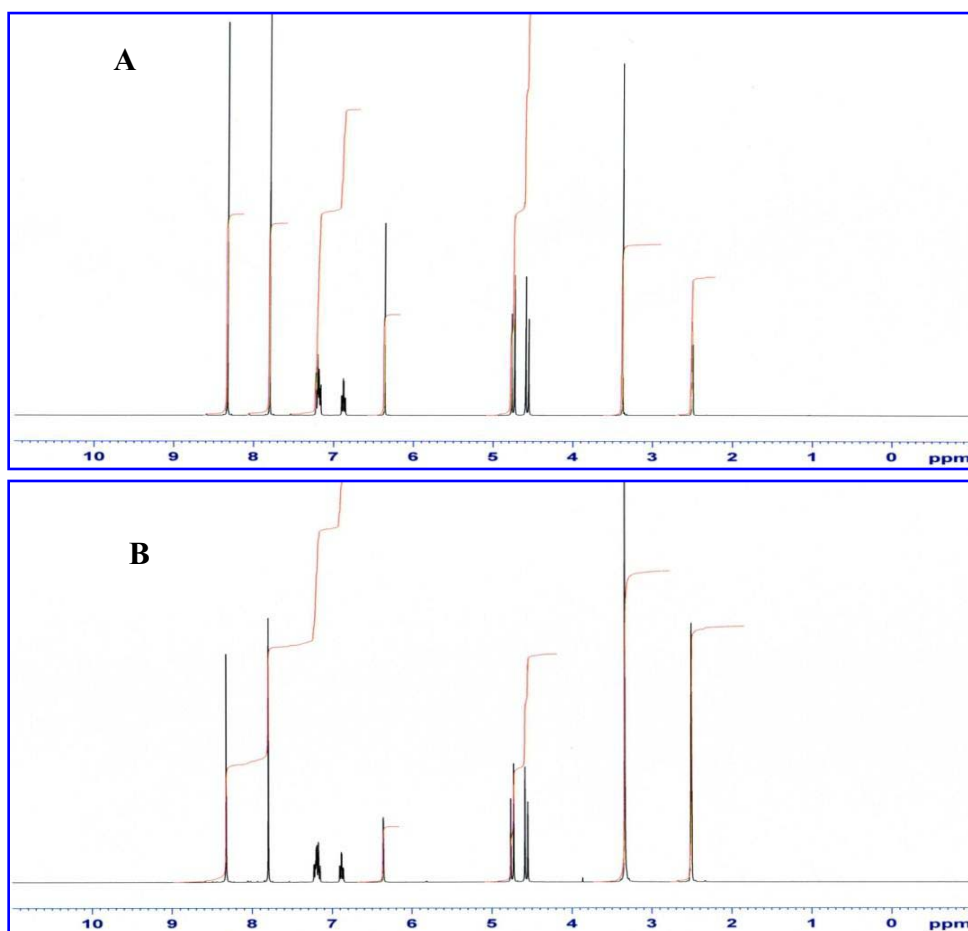
Widma $^1\text{H-}$ i $^{13}\text{C-NMR}$ dla FK wyjściowego były zgodne z danymi literaturowymi [49].

Analiza widm związku wyjściowego i napromieniowanego dawką 400 kGy nie wykazała zmian, jedynie niewielkie odchylenie wartości przesunięcia δ odpowiadające atomom węgla C2 i C4 w pierścieniu benzenowym oraz C12 w pierścieniu triazolu (Tabele 21 i 22).

Tabela 21. Wyniki analizy $^{13}\text{C-NMR}$ dla FK przed i po napromieniowaniu



Źródło sygnału	Przesunięcie chemiczne δ [ppm]		$\Delta \delta$ [ppm]	DEPT 135
	0 kGy	400 kGy		
C1	123,40	123,39	-0,01	0
C2	160,56	160,20	-0,36	0
C3	103,91	103,90	-0,01	+
C4	163,23	163,30	+0,07	0
C5	110,88	110,86	-0,02	+
C6	129,72	129,72	0,00	+
C7	73,68	73,67	-0,01	0
C8/8'	54,89	54,88	-0,01	-
C10/10'	145,10	145,11	+0,01	+
C12/12	150,73	150,79	+0,06	+

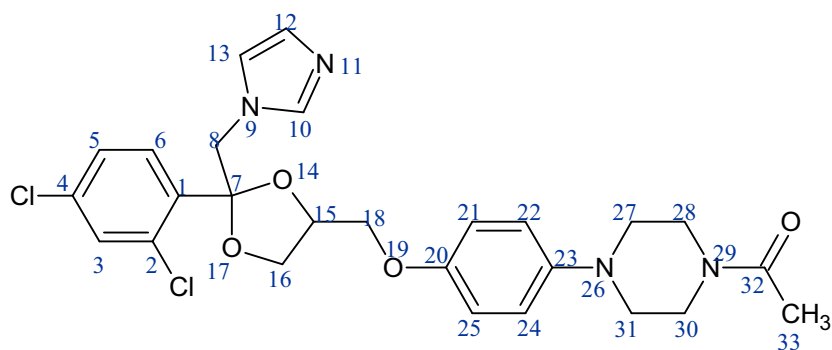


Ryc. 50. Widma $^1\text{H-NMR}$ dla FK przed (A) i po napromieniowaniu (B) dawką 400 kGy

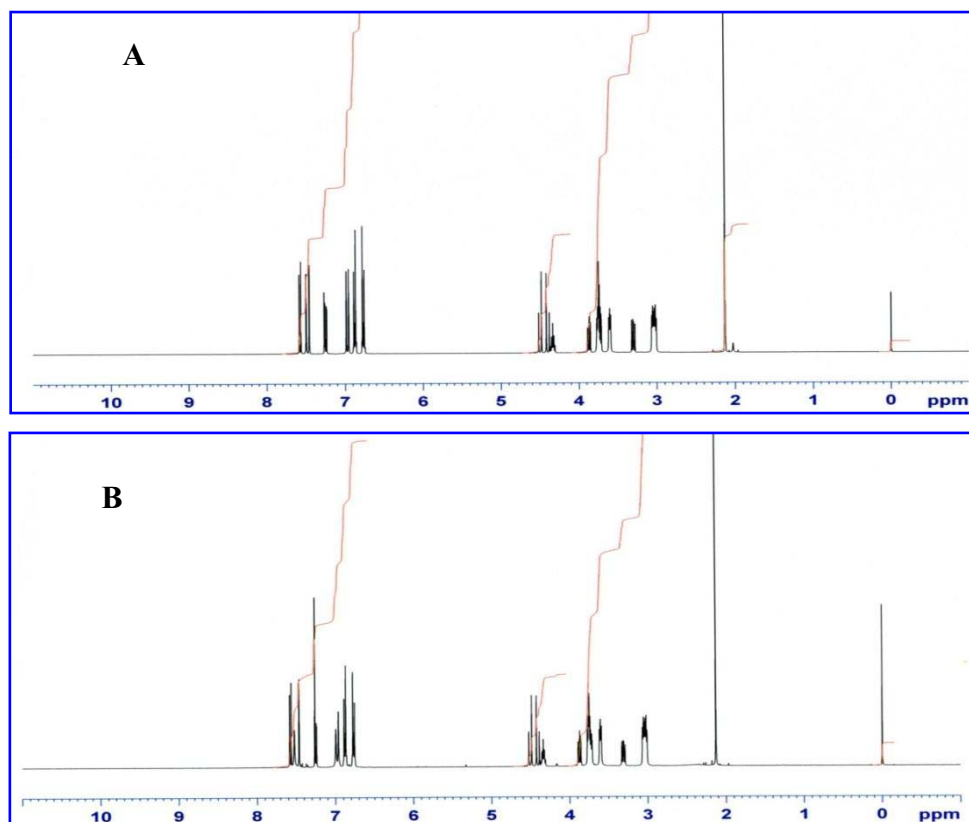
Tabela 22. Wyniki analizy $^1\text{H-NMR}$ dla FK przed i po napromieniowaniu

Źródło sygnału	Typ sygnału	Przesunięcie chemiczne δ [ppm]	
		0 kGy	400 kGy
H-3	m	6,88	6,88
H-5	m	7,20	7,19
H-6	m	7,22	7,21
H-8a/8a'	d	4,55; 4,59	4,55; 4,59
H-8b/8b'	d	4,73; 4,76	4,73; 4,76
H-10/10'	s	8,34	8,33
H-12/12'	s	7,80	7,80
H-14	s	6,38	6,38

Tabela 23. Wyniki analizy $^{13}\text{C-NMR}$ dla KK przed i po napromieniowaniu



Źródło sygnału	Przesunięcie chemiczne δ [ppm]		$\Delta \delta$ [ppm]	DEPT 135
	0 kGy	400 kGy		
C-1	135,88	135,93	+0,05	0
C-2	133,02	133,03	+0,01	0
C-3	131,38	131,40	+0,02	+
C-4	134,65	134,59	-0,06	0
C-5	127,22	127,24	+0,02	+
C-6	129,52	129,50	-0,02	+
C-7	108,05	108,03	-0,02	0
C-8	51,31	51,36	+0,05	-
C-10	138,83	138,75	-0,08	+
C-12	128,60	128,37	-0,23	+
C-13	121,17	121,21	+0,04	+
C-15	74,81	74,81	0,00	+
C-16	41,49	41,49	0,00	-
C-18	46,39	46,39	0,00	-
C-20	152,94	152,93	-0,01	0
C-21 i 25	115,32	115,33	+0,01	+
C-22 i 24	118,78	118,79	+0,01	+
C-23	145,78	145,79	+0,01	0
C-27 i 31	50,69 i 51,05	50,70 i 51,06	+0,01 i +0,01	-
C-28 i 30	67,59 i 67,75	67,58 i 67,74	+0,01 i -0,01	-
C-32	169,93	168,94	-0,99	0
C-33	21,31	21,31	0,00	+



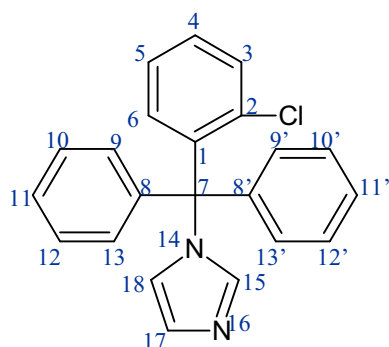
Ryc. 51. Widma ^1H -NMR dla KK przed (A) i po napromieniowaniu (B) dawką 400 kGy

Tabela 24. Wyniki analizy ^1H NMR dla KK przed i po napromieniowaniu

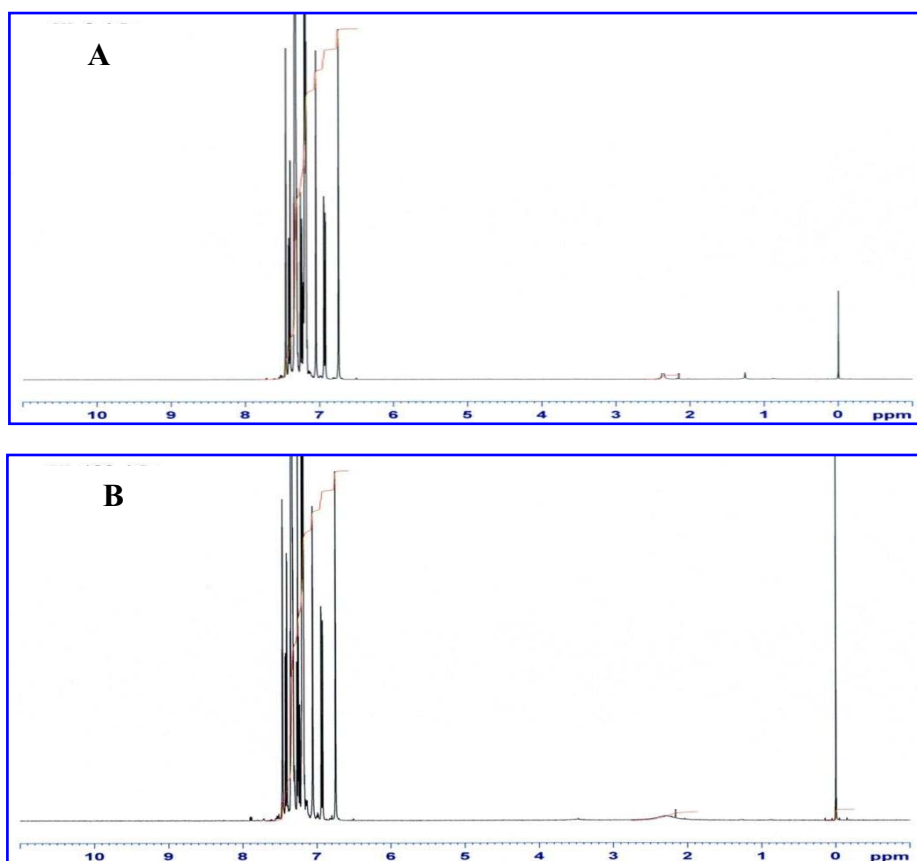
Źródło sygnału	Typ sygnału	Przesunięcie chemiczne δ [ppm]		$\Delta \delta$ [ppm]
		0 kGy	400 kGy	
H-3		7,46	7,47	+0,01
H-5	d	7,25	7,25	0,00
H-6	d	7,58	7,57	-0,01
H-8a	d	4,50	4,51	+0,01
H-8b	d	4,40	4,41	+0,01
H-10		7,50	7,52	+0,02
H-12		6,99	6,99	0,00
H-13		6,96	6,96	0,00
H-15	m	4,33	4,38	+0,05
H-16a		3,30	3,30	0,00
H-16b		3,84	3,85	0,01
H-18a	m	4,33	4,42	+0,09
H-18b	m	4,33	4,38	+0,05
H-21/25	d	6,88	6,88	0,00
H-22/24	d	6,77	6,77	0,00
H-27a,b/31a,b	m	3,05	3,04	-0,01
H-28a,b/30ab	m	3,75	3,75	0,00
H-33	s	2,15	2,15	0,00

Analiza widm ^{13}C -NMR dla KK przed i po napromieniowaniu wykazała zmiany przesunięć δ sygnałów atomu węgla C12 z 128,60 na 128,37 ppm oraz z 169,93 na 168,94 ppm karbonylowego atomu węgla C32. To ostatnie przesunięcie o prawie 1 jednostkę było największą obserwowaną zmianą w analizie widm NMR pochodnych azolu przed i po napromieniowaniu. Może ono świadczyć o zmianie w obrębie grupy acetylowej KK np. o rozerwaniu wiązania przy C32.

Tabela 25. Wyniki analizy ^{13}C -NMR dla CK przed i po napromieniowaniu



Źródło sygnału	Przesunięcie chemiczne δ [ppm]		$\Delta \delta$ [ppm]	DEPT 135
	0 kGy	400 kGy		
C1	140,95	140,95	0,00	0
C2	135,13	135,18	+0,05	0
C3	132,20	132,21	+0,01	+
C4	130,42	130,42	0,00	+
C5	127,00	127,01	+0,01	+
C6	129,83	129,83	0,00	+
C7	75,09	75,08	-0,01	0
C8/8'	140,43	140,43	0,00	0
C9/9' i C13/13'	128,00	128,00	0,00	+
C10/10 i C12/12'	130,17	130,16	-0,01	+
C11/11'	128,14	128,14	0,00	+
C15	139,13	139,12	-0,01	+
C17	128,46	128,46	0,00	+
C18	121,54	121,52	-0,02	+

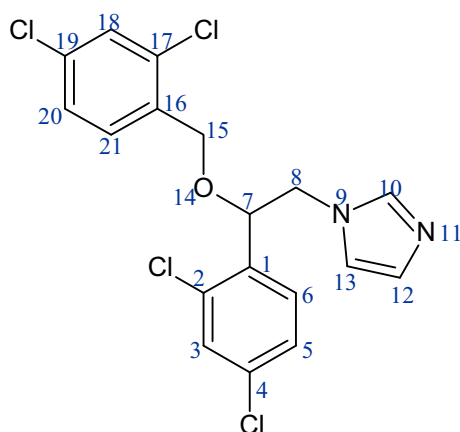


Ryc. 52. Widma $^1\text{H-NMR}$ dla CK przed (A) i po napromieniowaniu (B) dawką 400 kGy

Wszystkie sygnały widma $^1\text{H-NMR}$ dla CK mieszczą się w zakresie 6,74 do 7,46 ppm – Ryc. 44, Tabela 16. Potwierdza to obecność 14 atomów wodoru w trzech pierścieniach benzenowych i 3 atomów w pierścieniu imidazolowym. Jednakże nie przypisano dokładnych wartości przesunięć do właściwych im atomów, z uwagi na niewielkie różnice tych wartości. Taka analiza byłaby możliwa dopiero po wykonaniu badań z udziałem CK znakowanym izotopowo, lub z uwzględnieniem bardziej zaawansowanych technik dwuwymiarowej spektroskopii korelacyjnej (COSY, HETCOR).

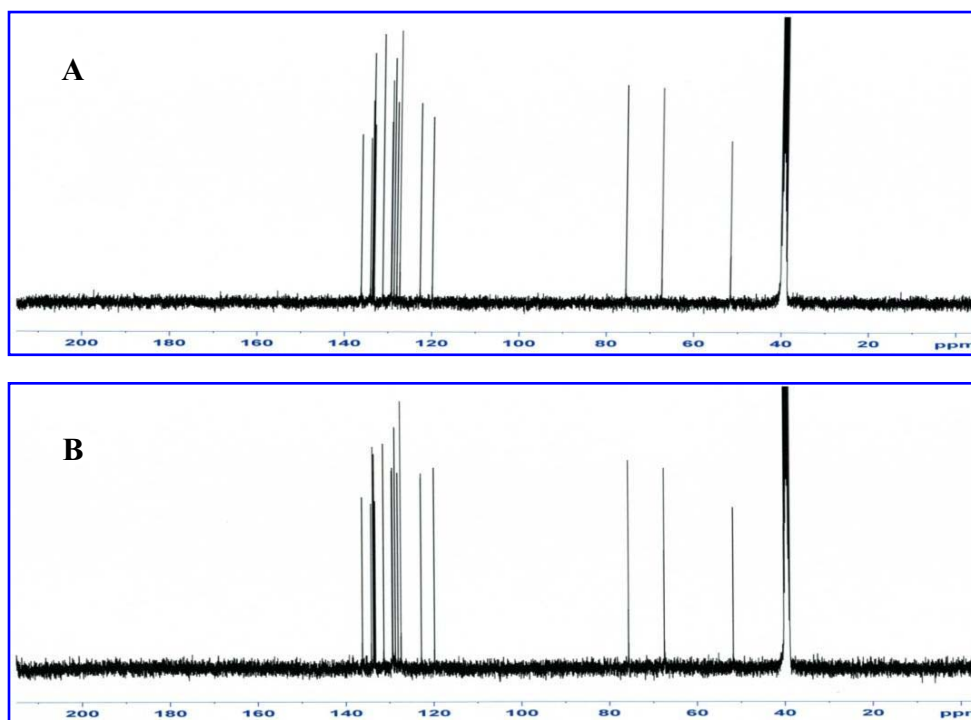
Tabela 26. Wyniki analizy $^1\text{H-NMR}$ dla CK przed i po napromieniowaniu

Dawka [kGy]	Przesunięcie chemiczne δ [ppm]																
0	6,75	6,92	6,94	7,05	7,18	7,19	7,20	7,24	7,26	7,30	7,32	7,33	7,34	7,35	7,40	7,42	7,45
400	6,75	6,92	6,94	7,06	7,18	7,19	7,20	7,25	7,26	7,31	7,32	7,33	7,34	7,35	7,40	7,42	7,46

Tabela 27. Wyniki analizy ^{13}C -NMR dla MK przed i po napromieniowaniu

Źródło sygnału	Przesunięcie chemiczne δ [ppm]		$\Delta \delta$ [ppm]	DEPT 135
	0 kGy	400 kGy		
C-1	134,10	134,11	+0,01	0
C-2	133,41	133,42	+0,01	0
C-3	127,38	127,38	0,00	+
C-4	133,68	133,67	-0,01	0
C-5	119,94	119,81	-0,13	+
C-6	128,06	128,07	+0,01	+
C-7	75,61	75,59	-0,02	+
C-8	51,74	51,77	+0,03	-
C-10	136,21	136,18	-0,03	+
C-12	128,69	128,69	0,00	+
C-13	122,73	122,77	+0,04	+
C-15	67,45	67,46	+0,01	-
C-16	133,68	133,67	-0,01	0
C-17	133,20	133,20	0,00	0
C-18	131,29	131,30	+0,01	+
C-19	133,47	133,49	+0,02	0
C-20	127,38	127,38	0,00	+
C-21	129,35	129,35	0,00	+

Widma NMR dla MK po napromieniowaniu także były zgodne z widmami związku wyjściowego, jedynie w widmie ^{13}C -NMR zaobserwowano niewielkie różnice przesunięć δ węgla C5 o 0,13 ppm, dla C13 o 0,04 ppm oraz dla C8 i C10 o 0,03 ppm. (Tabela 24).



Ryc. 53. Widma ^{13}C -NMR dla MK przed (A) i po napromieniowaniu
dawką 400 kGy (B)

Tabela 28. Wyniki analizy ^1H -NMR dla MK przed
i po napromieniowaniu

Źródło sygnału	Typ sygnału	Przesunięcie chemiczne δ [ppm]		$\Delta \delta$ [ppm]
		0 kGy	400 kGy	
H-3	s	7,72	7,72	0,00
H-5	m	7,52	7,53	+0,01
H-6	m	7,45	7,45	0,00
H-7	m	5,20	5,20	0,00
H-8a,b	m	4,55	4,54	-0,01
H-10	m	7,59	7,59	0,00
H-12	m	7,44	7,44	0,00
H-13	m	7,42	7,42	0,00
H-15a,b	s	4,45	4,46	+0,01
H-18	d	7,72	7,72	0,00
H-20	d	7,52	7,52	0,00
H-21	m	7,45	7,45	0,00

4.6.2.4. Analiza chromatograficzna TLC

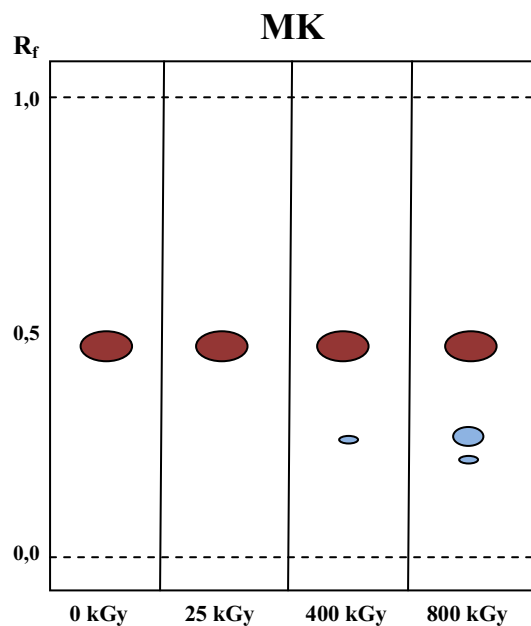
Badane pochodne azolu poddano analizie chromatograficznej techniką TLC według metodyki zamieszczonej w rozdziale 4.5.9. Na podstawie uzyskanych wyników można stwierdzić, że pochodne azolu są chromatograficznie czyste, gdyż dla nienapromieniowanych próbek nie obserwowano zanieczyszczeń. Wyniki analizy przedstawiono schematycznie na Ryc. 54. oraz zebrano w Tabeli 29

Tabela 29. Zestawienie wyników analizy TLC pochodnych azolu

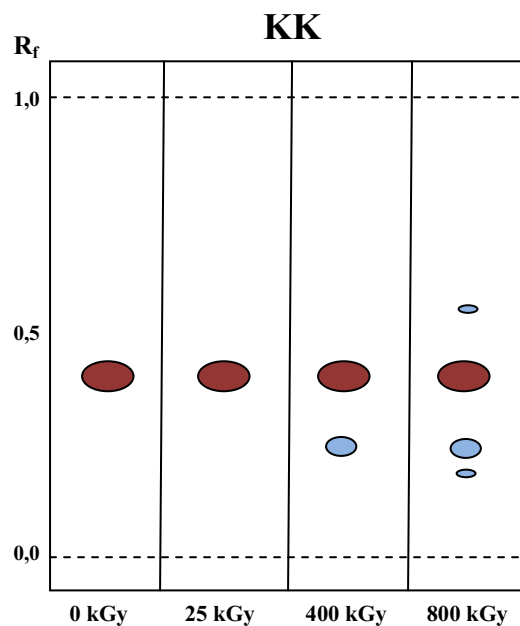
Związek badany	Faza ruchoma	Współczynnik opóźnienia R_f					
		0 kGy	25 kGy	100 kGy	200 kGy	400 kGy	800 kGy
MK	C toluen-metanol- amoniak (64:16:0,1 v/v/v)	0,48	0,48	0,49	0,49	0,48	0,26* 0,30 0,48
	C toluen-metanol- amoniak (64:16:0,1 v/v/v)	0,49	0,48	0,49	0,49	0,37 0,49 0,61*	0,36 0,48 0,60*
KK	B chloroform- metanol-woda (13,3:1,5:0,2 v/v/v)	0,44	0,44	0,45	0,32* 0,44	0,33 0,44	0,26* 0,33 0,44 0,56*
	A chloroform- aceton-metanol- 25% amoniak (4:4:1:0,1 v/v)	0,48	0,49	0,48	0,48 0,77* 0,82*	0,48 0,78 0,82	0,48 0,77 0,82
CK	D chlorek etylenu- aceton (1:1 v/v)	0,65	0,65	0,64 0,89*	0,64 0,82* 0,89	0,64 0,83 0,89	0,65 0,83 0,89
	E toluen-metanol (4:1 v/v)	0,55	0,55	0,43 0,54	0,43 0,55	0,34* 0,44 0,55	0,34* 0,43 0,55 0,70*

0,00 R_f związku badanego0,00 R_f produktu radiolizy

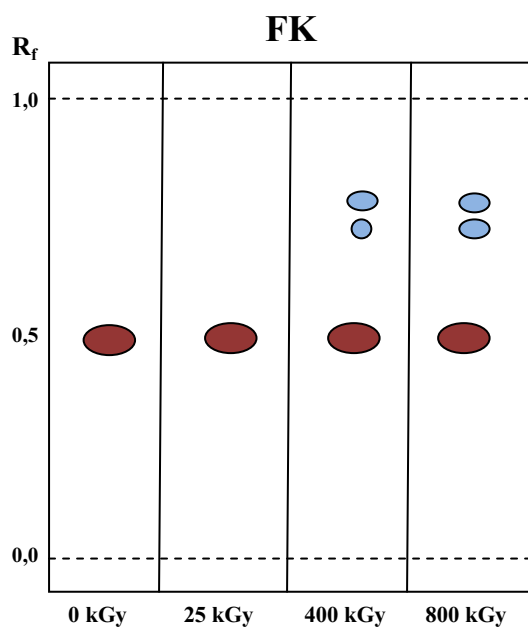
* ślady



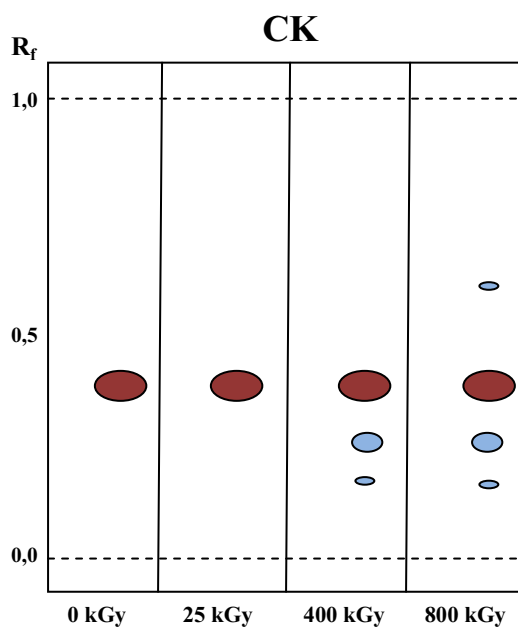
Faza ruchoma: toluen-metanol-amoniak (64:16:0,1)
 Stężenie roztworu nanoszonego: 10 mg/ml
 Ilość nanoszonego roztworu/ilość substancji: 50 μ l/0,5 mg
 Faza nieruchoma: żel krzemionkowy F₂₅₄



Faza ruchoma: chloroform-metanol-woda (13,3:1,5:0,2)
 Stężenie roztworu nanoszonego: 10 mg/ml
 Ilość nanoszonego roztworu/ilość substancji: 50 μ l/0,5 mg
 Faza nieruchoma: żel krzemionkowy F₂₅₄



Faza ruchoma: chloroform-aceton-metanol-25% amoniak (4:4:1:0,1)
 Stężenie roztworu nanoszonego: 10 mg/ml
 Ilość nanoszonego roztworu/ilość substancji: 50 μ l/0,5 mg
 Faza nieruchoma: żel krzemionkowy F₂₅₄

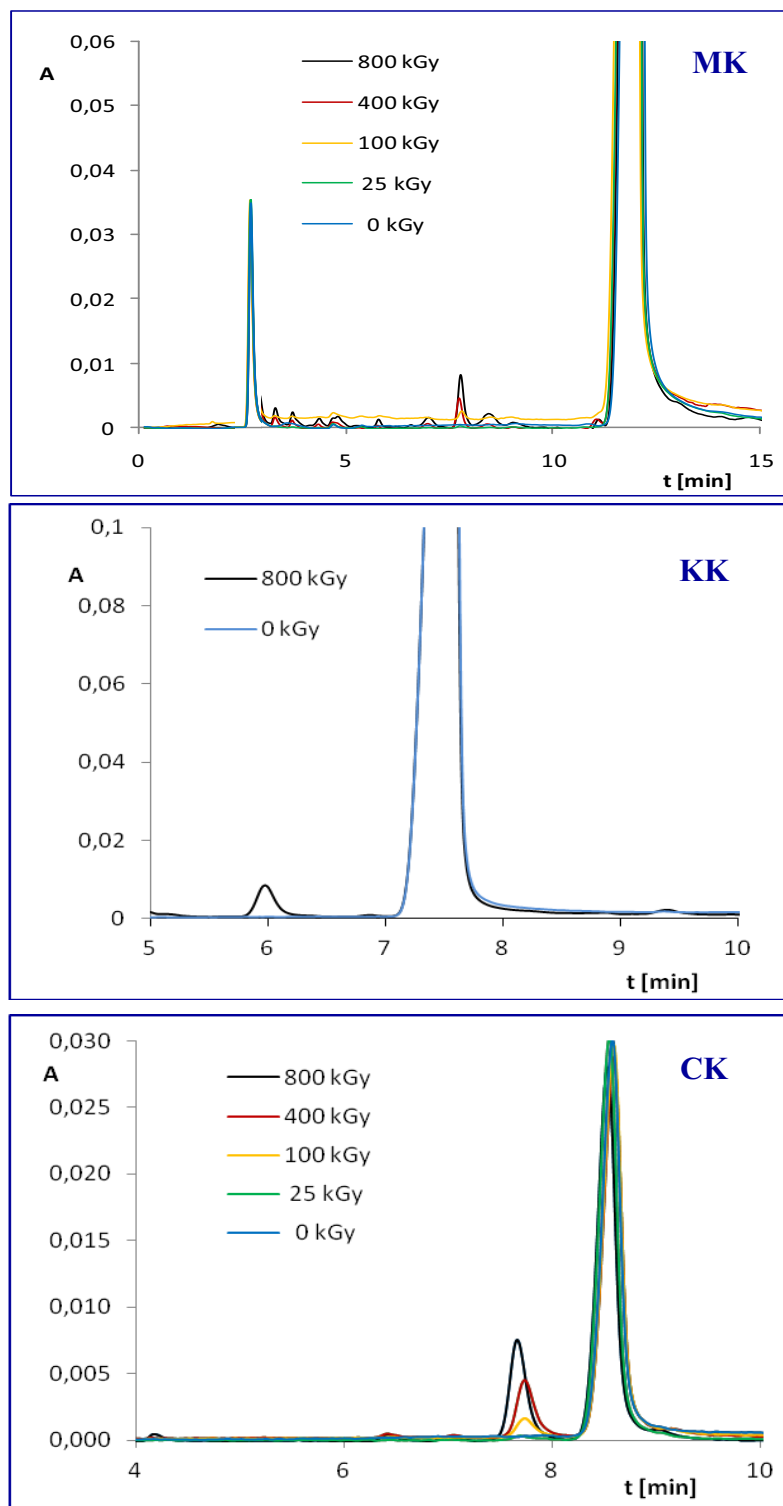


Faza ruchoma: toluen-metanol (4:1)
 Stężenie roztworu nanoszonego: 10 mg/ml
 Ilość nanoszonego roztworu/ilość substancji: 50 μ l/0,5 mg
 Faza nieruchoma: żel krzemionkowy F₂₅₄

Ryc. 54. Schematy wybranych chromatogramów TLC pochodnych azolu przed i po napromieniowaniu

4.6.2.5. Analiza chromatograficzna HPLC

Analizę wykonano zgodnie z metodyką zawartą w punkcie 4.5.10., wyniki zamieszczono na Ryc. 55. i w Tabeli 30.



Ryc. 55. Chromatogramy HPLC dla MK, KK i CK przed i po napromieniowaniu

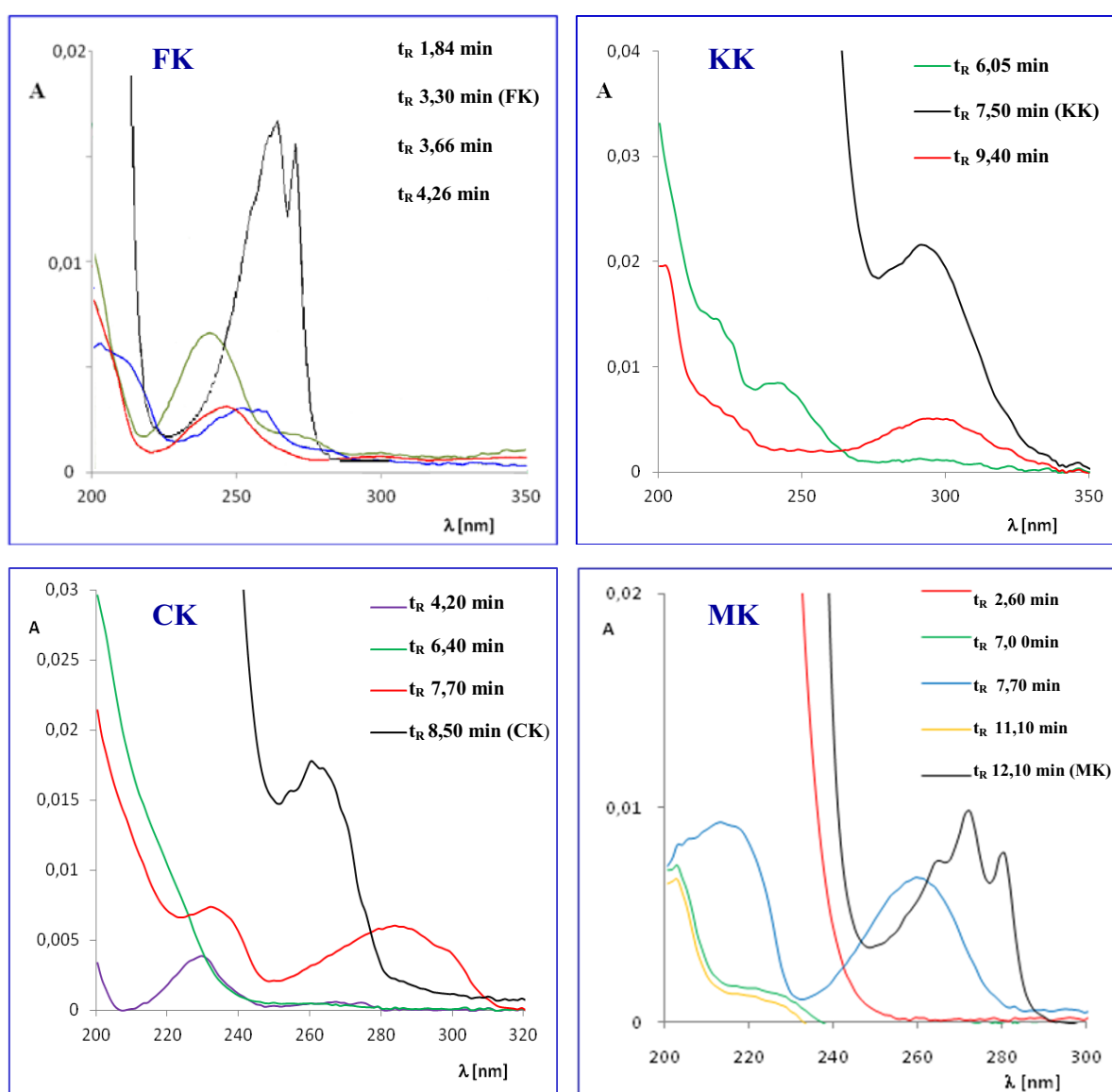
Tabela 30. Wyniki analizy HPLC pochodnych azolu przed i po napromieniowaniu

Dawka [kGy]	Czas retencji t_R [min]	Liczba produktów radiolizy	Zawartość [%]
FK			
0	3,30	0	100,0
25	3,30	0	99,5
50	3,30	0	98,1
100	1,84; 3,30; 4,26	2	95,7
200	1,84; 3,30; 3,66; 4,26	3	92,9
MK			
0	2,6; 12,1	0	99,7
25	2,6; 12,1	0	100,1
100	2,6; 7,7; 12,1	1	97,2
400	2,6; 7,0; 7,7; 8,5; 12,1	4	94,0
800	2,6; 7,0; 7,7; 8,5; 12,1	4	89,6
KK			
0	7,50	0	100,0
25	7,50	0	99,4
100	6,05; 7,50; 9,40	2	98,4
400	6,05; 7,50; 9,40	2	96,3
800	6,05; 7,50; 9,40	2	94,3
CK			
0	8,5	0	100,0
25	7,7; 8,5	1	100,0
100	7,7; 8,5	1	100,0
400	7,7; 8,5	1	95,8
800	4,5; 6,4; 7,7; 8,5	3	93,7

Wszystkie badane pochodne azolu za wyjątkiem MK były chromatograficznie czyste, tzn. że nie wykryto w związkach wyjściowych zanieczyszczeń (MK zawierał jedno zanieczyszczenie o $t_R = 2,6$ min, którego zawartość wynosiła 0,3%), a ich wartości czasu retencji t_R były zgodne w danych układach faz z wartościami t_R wzorców. Analizę ilościową wykonano metodą porównania ze wzorcem. Zawartość związków wyjściowych była w zakresie 99,7 - 100,0% (Tabela 32).

Po napromieniowaniu obserwowano pojawienie się produktów rozkładu i spadek zawartości związków. Największy obserwowany ubytek zawartości był w przypadku MK (-10,4% dla 800 kGy). Pod wpływem standardowej dawki sterylizacyjnej (25 kGy) jedynie w przypadku CK stwierdzono obecność produktu radiolizy ($t_R = 7,7$ min), jednakże występował on w ilościach śladowych (ubytek zawartości związku był w granicach błędów metody).

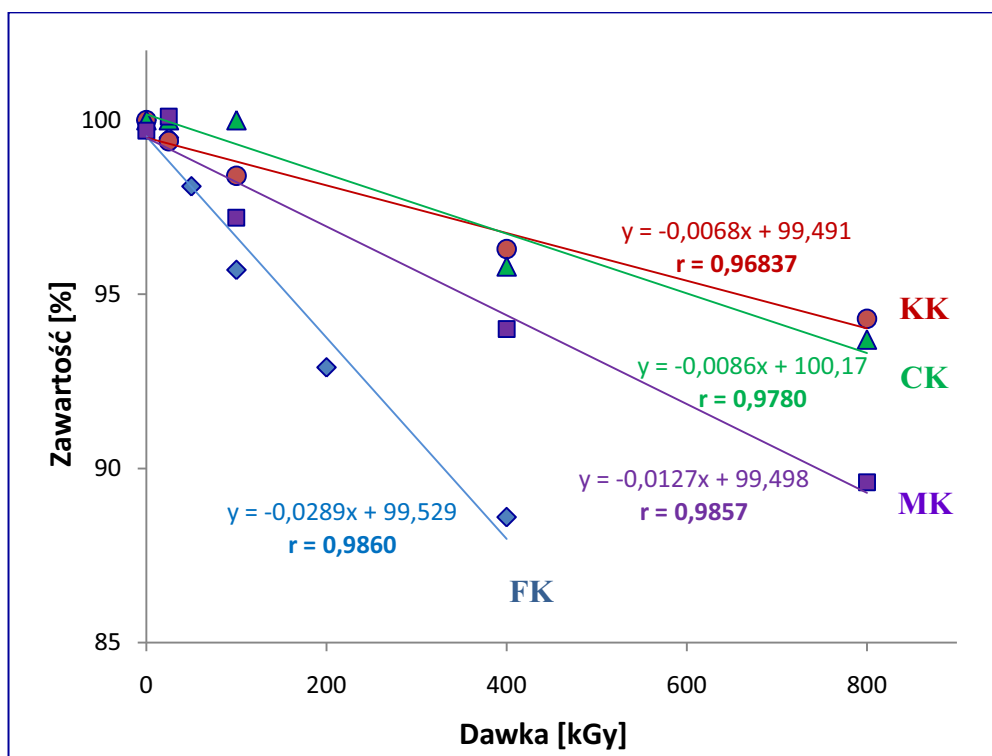
Dysponowano następującymi wzorcami zanieczyszczeń: imidazolem, 2-chlorobenzofenonem oraz 2-(chlorofenyl)-difenylometanolem. Tylko wykryto śladowe ilości 2-(chlorofenyl)-difenylometanolu wykryto w próbkach CK napromieniowanego dawką 800 kGy (t_R 6,4 min). Za pomocą detektora DAD wykreślono widma UV produktów radiolizy pochodnych azolu, które przedstawiono na Ryc. 56.



Ryc. 56. Widma absorpcji pochodnych azolu oraz ich produktów radiolizy (po napromieniowaniu dawką 800 kGy)

Na Ryc. 57. przedstawiono zawartość procentowa badanych pochodnych azolu poddanych napromieniowaniu wiązką elektronów w fazie stałej w dawkach od 25 do 800 kGy (do 400 kGy w przypadku FK).

W tym zakresie dawek zależności zawartość vs dawka przebiega odwrotnie proporcjonalnie, a korelacja tych zależności wynosi od 0,9637 dla MK, do 0,9860 dla FK.



Ryc. 57. Zawartość FK, CK, KK i MK (oznaczona metoda HPLC) vs dawka promieniowania

Podobnie przedstawiają się zależności \ln zawartości procentowej vs dawki, jednakże korelacja powstałych linii trendu jest na wyższym poziomie czyli między 0,9791 dla CK a 0,9886 dla FK.

Na podstawie zgromadzonych wyników analizy ilościowej obliczono wydajność radiolityczną procesu rozkładu pochodnych azolu, a wyniki zebrano w Tabeli 31.

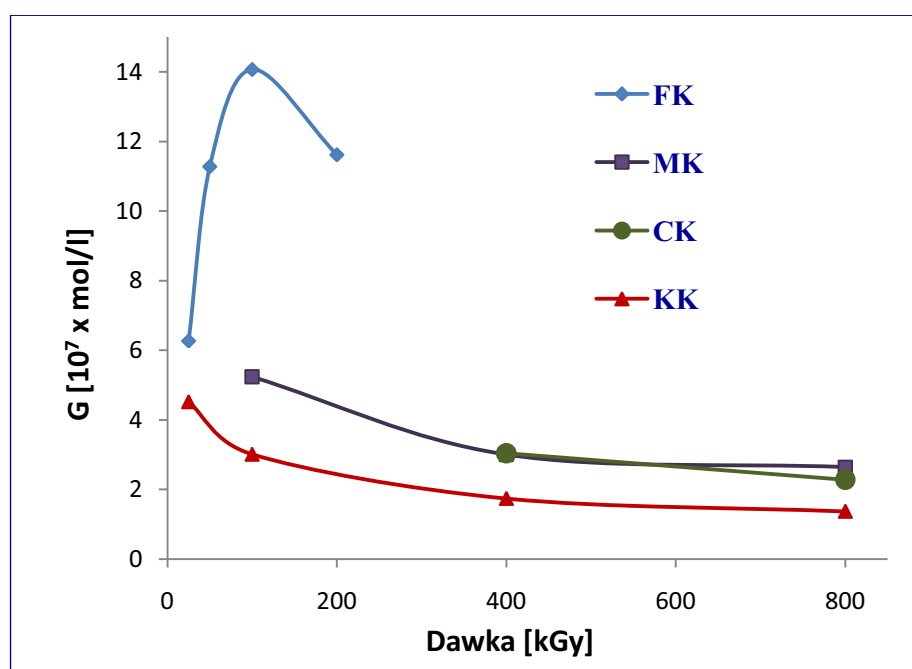
Otrzymane wartości G mieszczą się w zakresie do 1,29 do 13,57 cząsteczek/100eV (tj. $1,34\text{-}14,07 \times 10^7$ mol/J), co jest porównywalne za średnimi wartościami wydajności radiolitycznych innych związków leczniczych w fazie stałej [33,138-140].

Wydajność radiolityczna pochodnych azolu zmienia się w zależności od dawki dla każdego związku, lecz aby stwierdzić jednoznacznie czy mamy do czynienia ze spadkiem jej wartości wraz z dawką promieniowania (przypadek KK) czy z oscylacją wokół stałej wartości, czy z jeszcze bardziej złożoną funkcją (Ryc. 58.) należałoby wykonać badania dla dużo większej liczby dawek (10-15 dawek).

Tabela 31. Wydajność radiolityczna procesu radiodegradacji

Dawka (kGy)	Związek badany			
	CK	MK	FK	KK
	Wydajność radiolityczna G			
	[cząsteczek/100 eV]			
25	*	*	6,05	4,35
50	-	-	11,84	-
100	*	5,05	13,57	2,90
200	-	-	11,21	-
400	2,93	2,89	-	1,68
800	2,20	2,55	-	1,29
	[$\times 10^7$ mol/J]			
25	*	*	6,27	4,52
50	-	-	11,28	-
100	*	5,24	14,07	3,01
200	-	-	11,62	-
400	3,04	3,00	-	1,74
800	2,28	2,64	-	1,34

* brak ubytku zawartości - brak danych



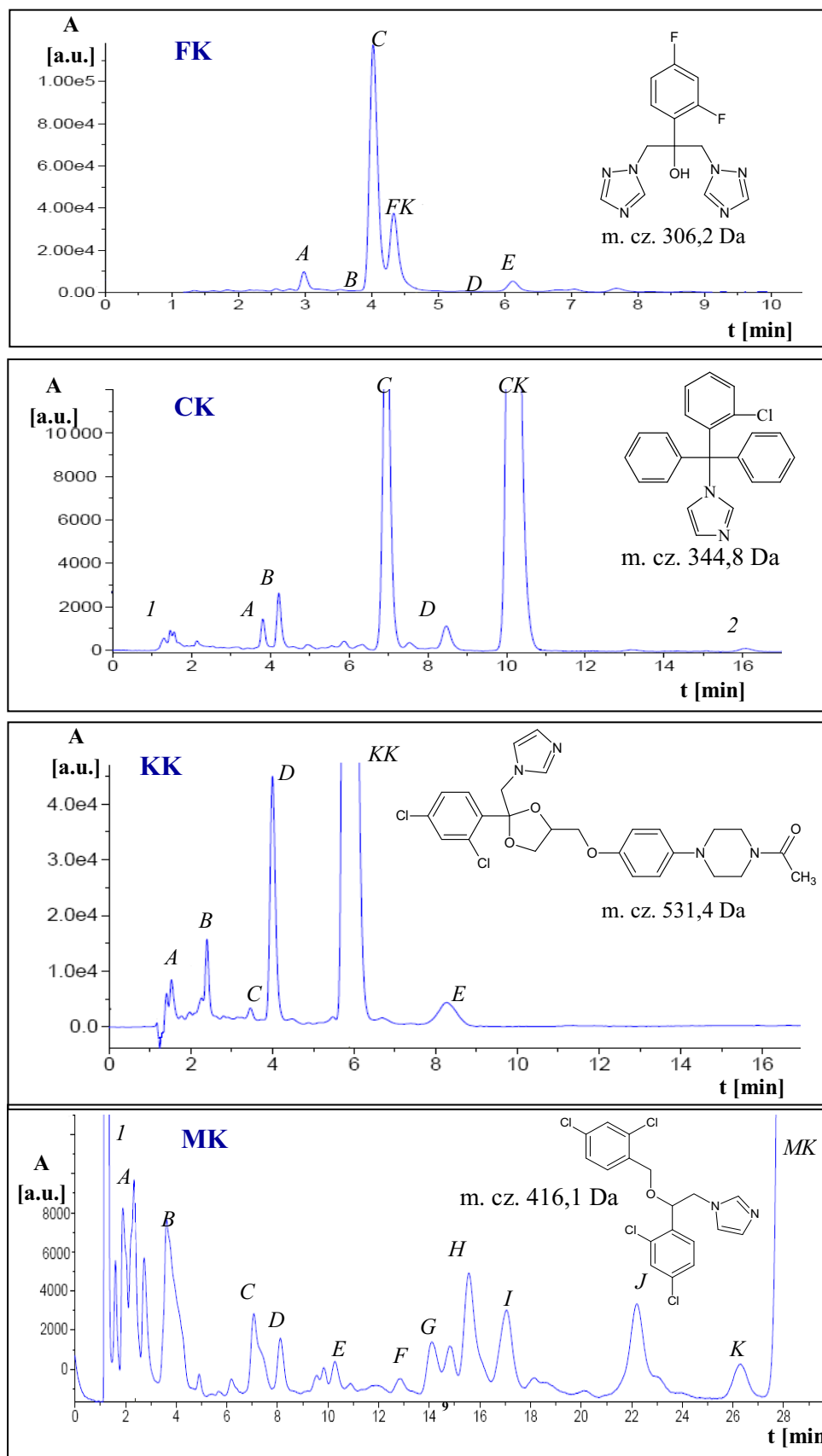
Ryc. 58. Zależność G od dawki w procesie radiolizy pochodnych azolu

4.6.2.6. Analiza HPLC-MS

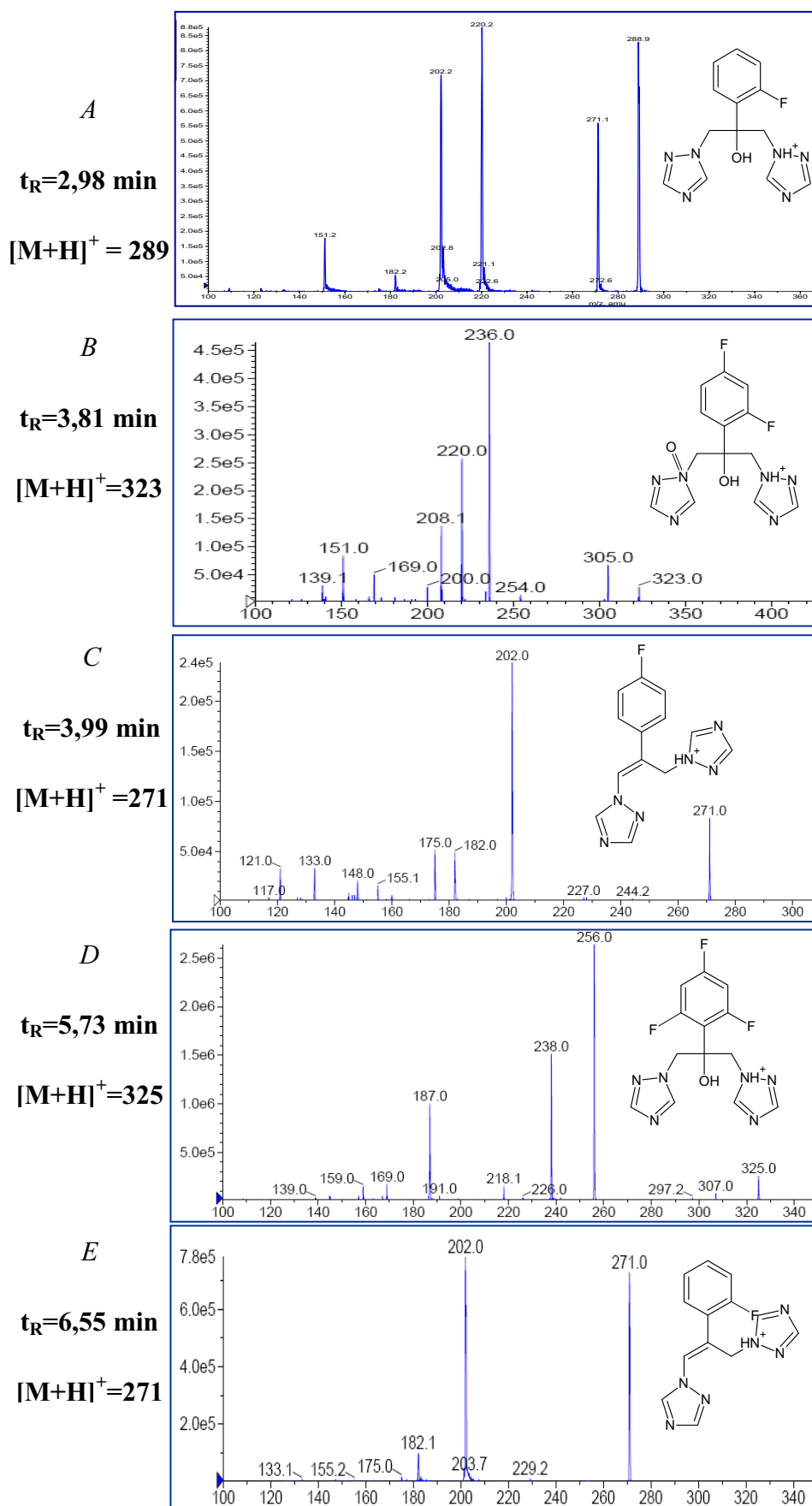
Identyfikację produktów radiolizy badanych pochodnych azolu przeprowadzono metodą chromatografii ciekowej sprzężonej ze spektrometrem mas zgodnie z metodyką opisaną w rozdziale 4.5.2.4.

Na poniższych rycinach zamieszczono kolejno chromatogramy HPLC (Ryc. 59.) oraz widma masowe i proponowane wzory zidentyfikowanych produktów radiodegradacji (Ryc. 60, 62, 64, 66) oraz fragmentacje masowe potwierdzające struktury produktów (Ryc. 61, 63, 65, 67). W Tabelach 32-34 zestawiono masy cząsteczkowe, wzory strukturalne, sumaryczne i nazwy chemiczne wg UIPAC zidentyfikowanych produktów radiolizy.

Posłużyły one z kolei do zaproponowania najbardziej prawdopodobnych schematów radiolizy poszczególnych zbadanych pochodnych azolu.

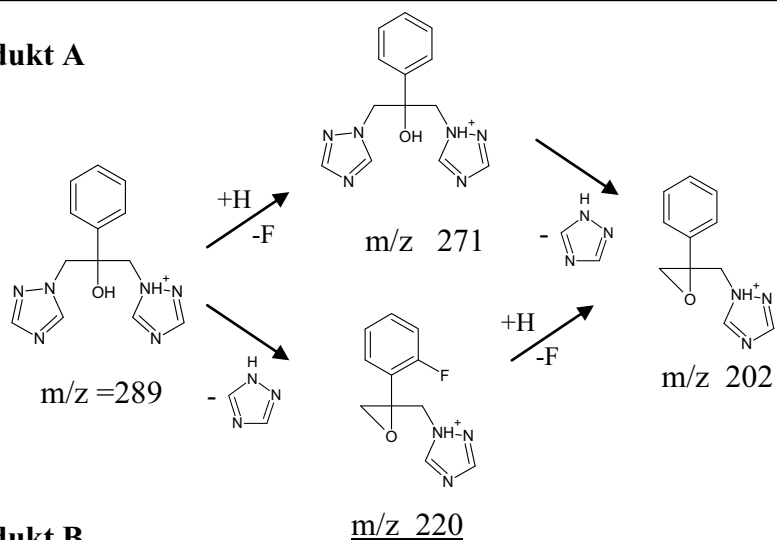


Ryc. 59. Chromatogramy HPLC pochodnych azolu napromieniowanych dawką 800 kGy (A, B, C... K – produkty radiolizy, 1 i 2 – zanieczyszczenia obecne w związku wyjściowym)

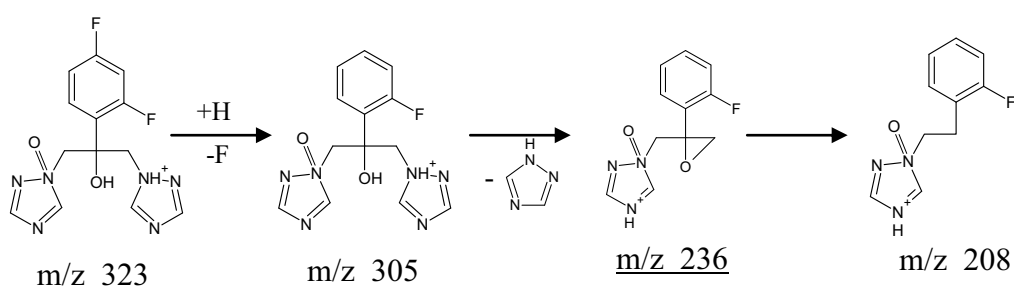


Ryc. 60. Widma CID produktów radiolizy FK

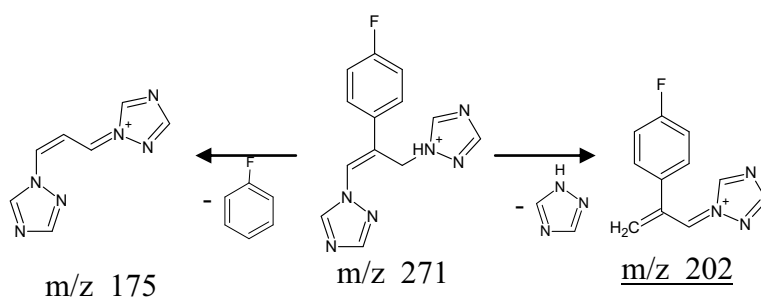
Produkt A



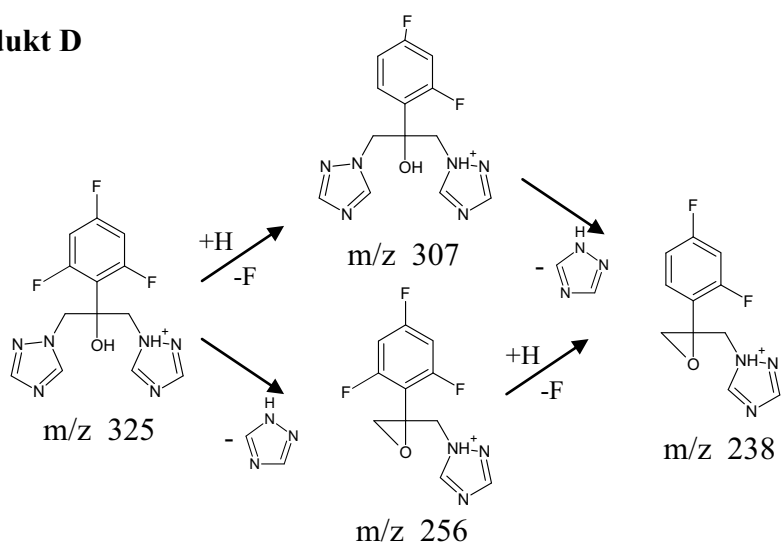
Produkt B



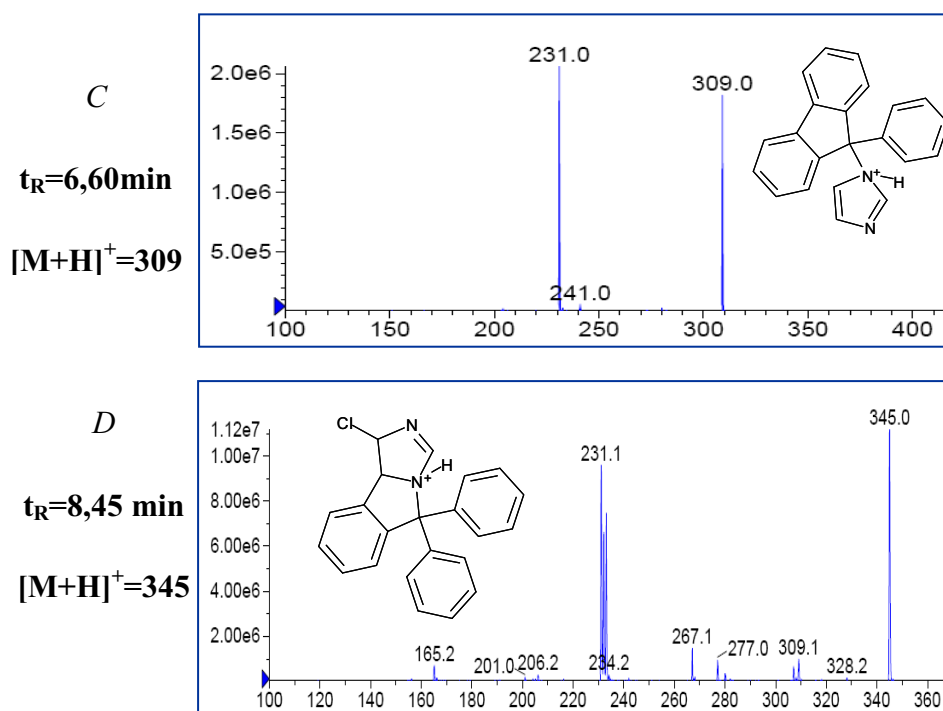
Produkt C



Produkt D

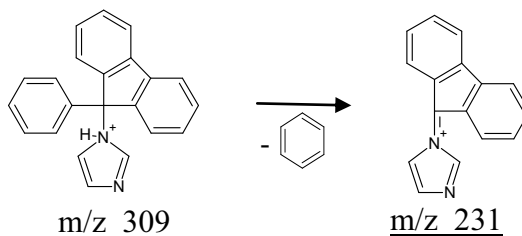


Ryc. 61. Wybrane fragmentacje masowe produktów radiolizy FK

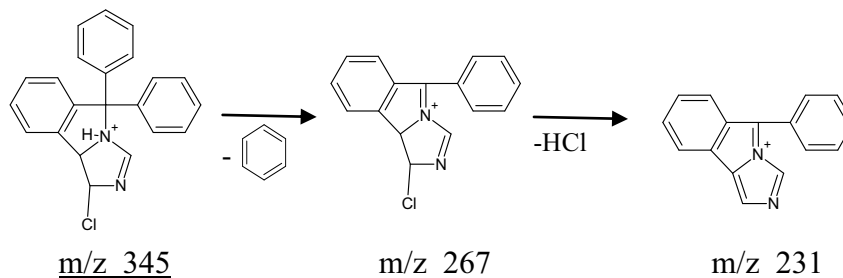


Ryc. 62. Widma CID produktów radiolizy CK

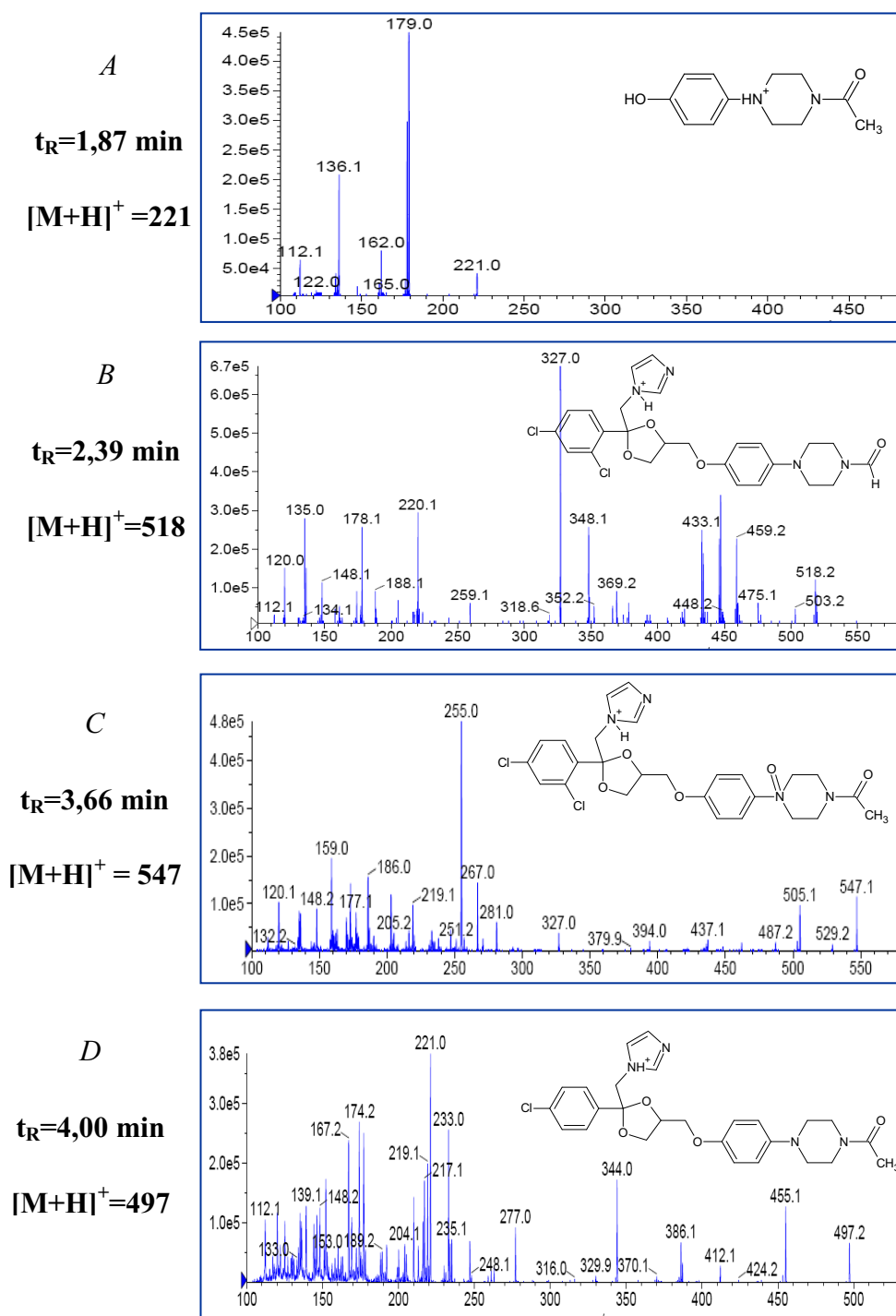
Produkt C



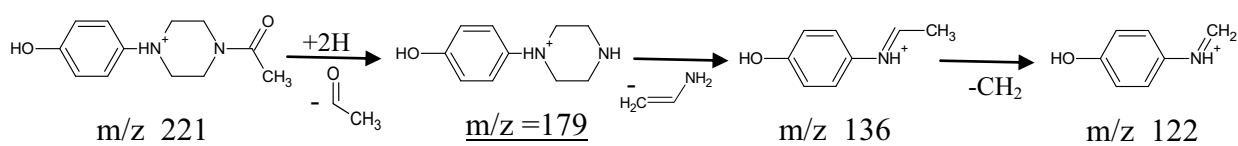
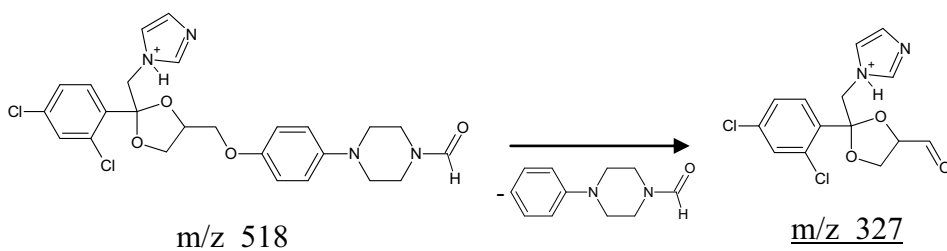
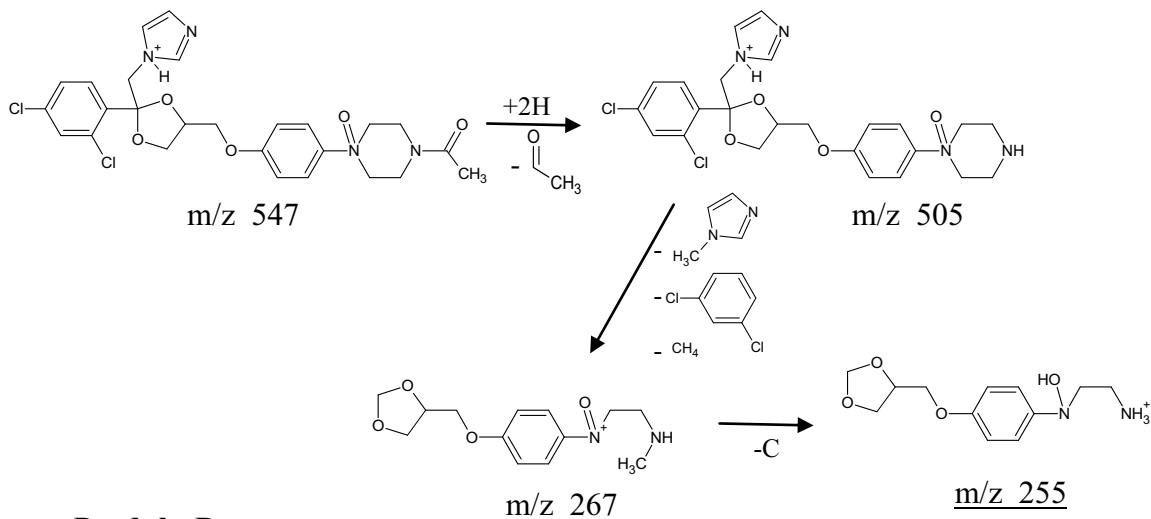
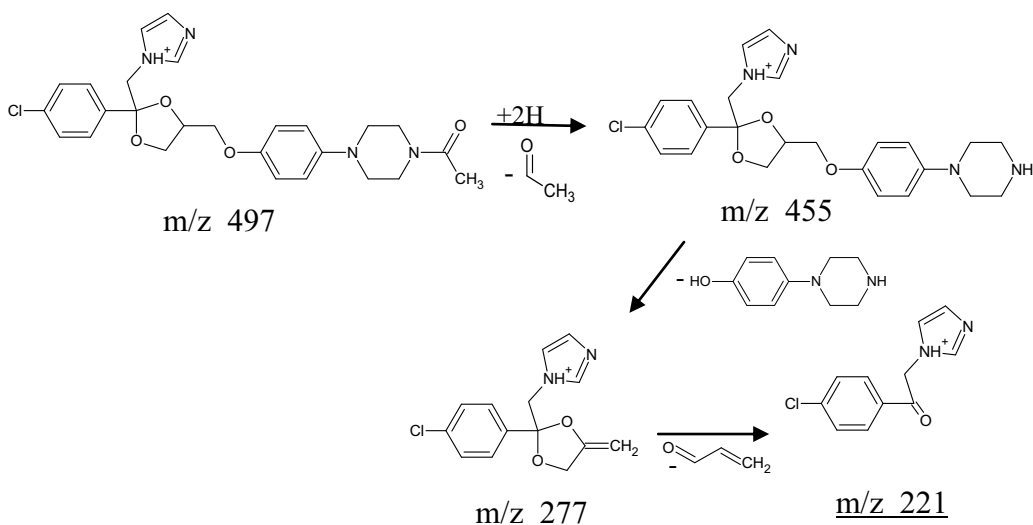
Produkt D

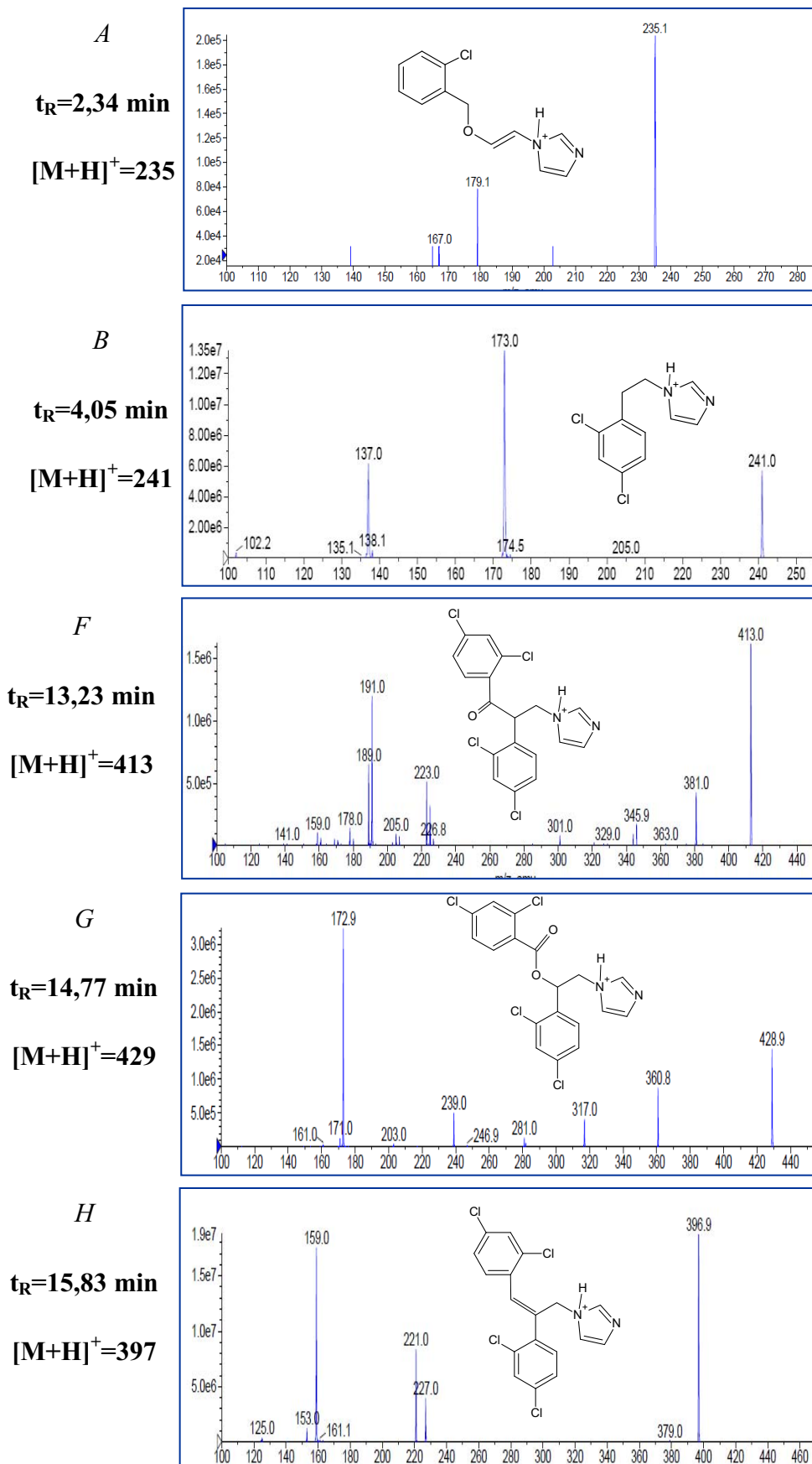


Ryc. 63. Wybrane fragmentacje masowe produktów radiolizy CK

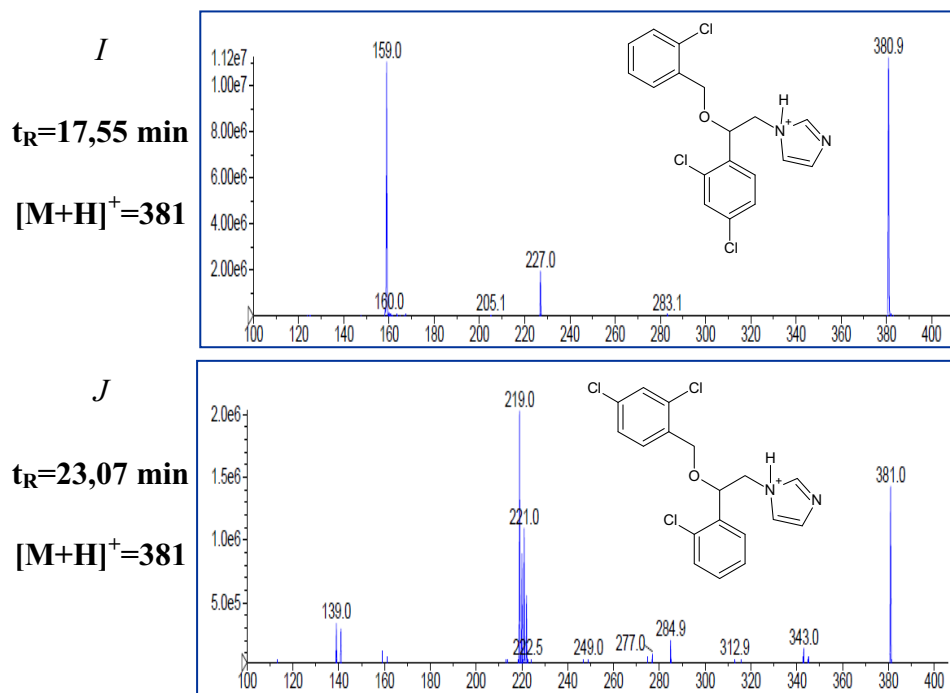


Ryc.64. Widma CID produktów radiolizy KK

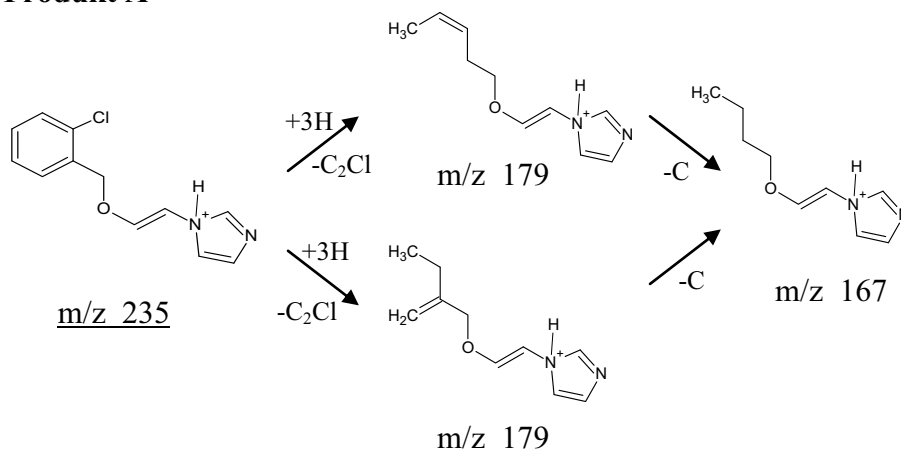
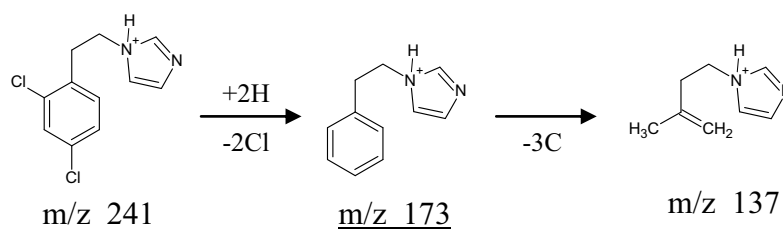
Produkt A**Produkt B****Produkt C****Produkt D****Ryc. 65. Wybrane fragmentacje masowe produktów radiolizy KK**



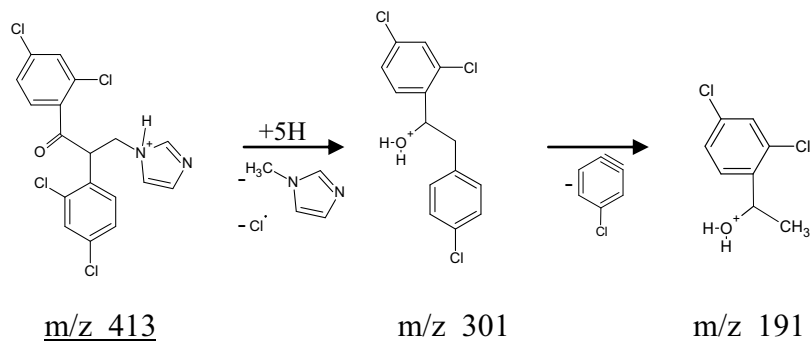
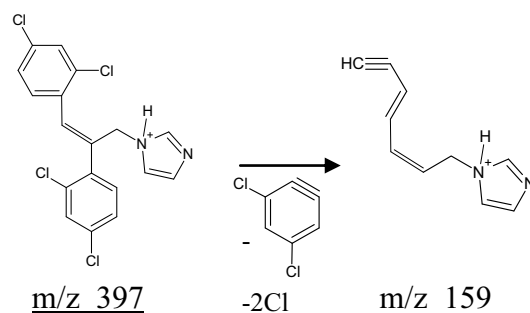
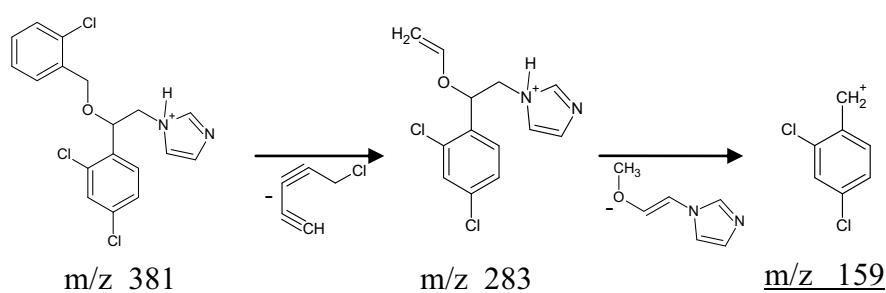
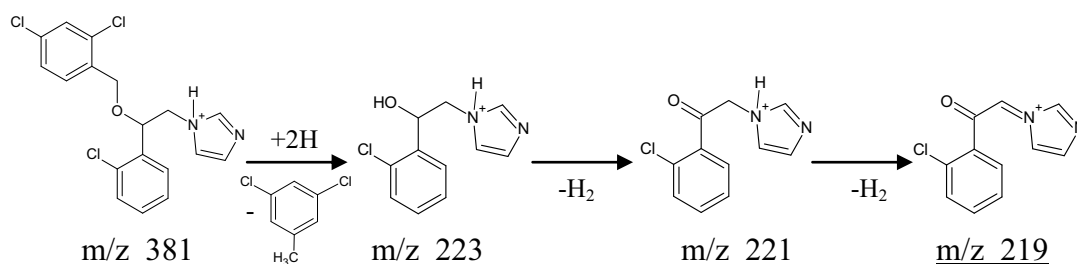
Ryc. 66. Widma CID produktów radiolizy MK



Ryc. 66. Widma CID produktów radiolizy MK c. d.

Produkt A**Produkt B**

Ryc. 67. Wybrane fragmentacje masowe produktów radiolizy MK

Produkt F**Produkt H****Produkt I****Produkt J**

Ryc. 67. Wybrane fragmentacje masowe produktów radiolizy MK c. d.

Tabela 32. Zestawienie proponowanych struktur produktów radiodegradacji FK

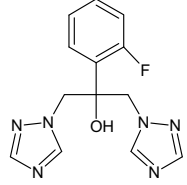
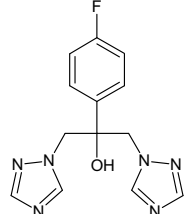
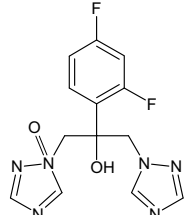
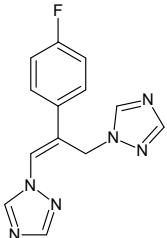
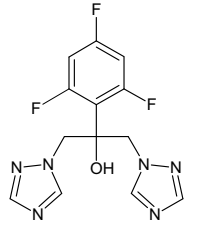
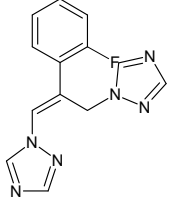
Symbol	t_R [min]	Wzór sumaryczny, nazwa chemiczna	Masa cząsteczkowa	Wzór strukturalny
A	2,98	$C_{13}H_{13}FN_6O$ 2-(2-fluorofenylo)-1,3- di(1 <i>H</i> -1,2,4-triazol-1- ylo)propan-2-ol	288,28	
A'		lub 2-(4-fluorofenylo)-1,3- di(1 <i>H</i> -1,2,4-triazol-1- ylo)propan-2-ol		
B	3,81	$C_{13}H_{12}F_2N_6O_2$ 2-(2,4-difluorofenylo)- 1-(1-oksydo-1 <i>H</i> -1,2,4- triazol-1-ylo)-3-(1 <i>H</i> - 1,2,4-triazol-1yl) propan-2-ol	322,27	
C	3,99	$C_{13}H_{11}FN_6$ 1,1'-[(2-(4- fluorofenylo)prop-1- ene-1,3-dilo]bis(1 <i>H</i> - 1,2,4-triazol)	270,27	
D	5,73	$C_{13}H_{11}F_3N_6O_2$ 1,3-di(1 <i>H</i> -1,2,4- triazol-1-ylo)-2-(2,4,6- trifluorofenylo)propan- 2-ol	324,26	
E	6,55	$C_{13}H_{11}FN_6$ 1,1'-[(1 <i>Z</i>)-2-(2- fluorofenylo)prop-1- ene-1,3-dilo]bis(1 <i>H</i> - 1,2,4-triazol)	270,27	

Tabela 33. Zestawienie proponowanych struktur produktów radiodegradacji CK i KK

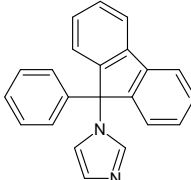
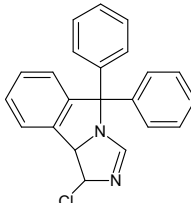
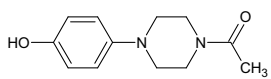
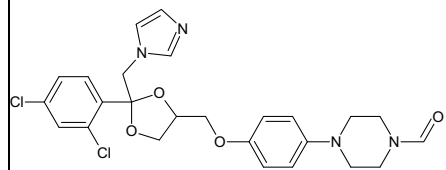
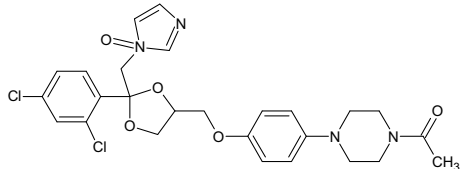
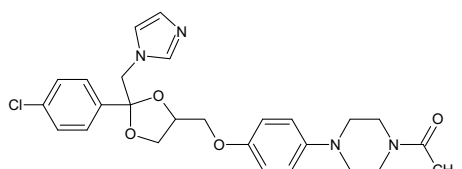
Symbol	t_R [min]	Wzór sumaryczny, nazwa chemiczna	Masa cząstecz.	Wzór strukturalny
CK				
C	6,60	$C_{22}H_{16}N_2$ 1-(9-fenyl-9H-fluoren-9-yl)- 1H-imidazol	308,38	
D	8,45	$C_{22}H_{17}ClN_2$ 1-chloro-5,5-difenyl-5,9b- dihydro-1H-imidazo[5,1- a]izoindol	344,84	
KK				
A	1,87	$C_{12}H_{16}N_2O_2$ 1-[4-(4-hydroksy-fenyl)- piperazin-1-yl]etanon	220,27	
B	2,39	$C_{25}H_{26}Cl_2N_4O_4$ 1-[4-[4-[[2-(2,4- dichlorofenyl)-2-(imidazol-1- ylometylo)-1,3-dioksolan-4- yl]metoksy]fenyl]piperazyn- 1-yl]metanon	517,40	
C	3,66	$C_{26}H_{28}Cl_2N_4O_5$ 1-[4-[4-[[2-(2,4-dichloro- fenyl)-2-(1-oksydoimidazol- 1-ylometylo)-1,3-dioksolan-4- yl]metoksy]fenyl]- piperazyn-1-yl]etanon	547,43	
D	4,00	$C_{25}H_{29}ClN_4O_4$ 1-[4-[4-[[2-(4-chlorofenyl)-2- (imidazol-1-ylometylo)-1,3- dioksolan-4- yl]metoksy]fenyl]piperazyn- 1-yl]etanon	496,99	

Tabela 34. Zestawienie proponowanych struktur produktów radiodegradacji MK

Symbol	t_R [min]	Wzór sumaryczny, nazwa chemiczna	Masa cząstecz.	Wzór strukturalny
A	2,34	$C_{12}H_{11}ClN_2O$ 1-{2-[(2-chlorobenzyl)oksy]etenyl}-1H-imidazol	234,68	
B	4,05	$C_{11}H_{10}Cl_2N_2$ 1-[2-(2,4-dichlorofenyl)etylo]-1H-imidazol	241,17	
F	13,23	$C_{11}H_{10}Cl_2N_2$ 1,2-bis(2,4-dichlorofenyl)-3-(1H-imidazol-1-yl)propan-1-on	414,11	
G	14,77	$C_{18}H_{12}Cl_4N_2O_2$ 1-(2,4-dichlorofenyl)-2-(1H-imidazol-1-yl)etylo 2,4-dichlorobenzoesan	430,11	
H	15,83	$C_{18}H_{12}Cl_4N_2$ 1-[2,3-bis(2,4-dichlorofenyl)prop-2-en-1-yl]-1H-imidazol	398,11	
I	17,55	$C_{18}H_{15}C_3N_2O$ 1-{2-[(2-chlorobenzyl)oksy]-2-(2,4-dichlorofenyl)etylo}-1H-imidazol	381,68	
J	23,07	$C_{18}H_{15}C_3N_2O$ 1-{2-(2-chlorofenyl)-2-[(2,4-dichlorobenzyl)oksy]etylo}-1H-imidazol	381,68	

5. Dyskusja wyników

Wpływ promieniowania jonizującego na substancje lecznicze zależy od budowy chemicznej leku, zastosowanej dawki i źródła promieniowania, jak również od warunków, w jakich przeprowadzany jest proces napromieniowywania [28,35-39,140,141].

Sprawia to, że trwałość radiochemiczna, czyli odporność leków na promieniowanie jonizujące, powinna być określona dla każdego leku indywidualnie, z uwzględnieniem wszystkich parametrów mogących mieć wpływ na przebieg radiolizy.

Celem niniejszej pracy było określenie wpływu promieniowania jonizującego na cztery pochodne azolu w **stanie stałym** przy zastosowaniu wiązki wysokoenergetycznych elektronów w standardowej dawce sterylizacyjnej 25 kGy, a tym samym ustalenie czy związki te mają wystarczającą trwałość radiochemiczną aby mogły być sterylizowane tą metodą. Następnie założono poszukiwanie zmian we właściwościach fizykochemicznych tych związków po zastosowaniu promieniowania jonizującego w dawkach wyższych (50-800 kGy), a także wykrycie, rozdzielenie, zidentyfikowanie i oznaczenie powstających produktów radiolizy.

Wybrane do badań popularne substancje lecznicze pochodne azolu o działaniu przeciwgrzybiczym (flukonazol - FK, ketokonazol - KK, klotrymazol CK i azotan mikonazolu - MK) napromieniowywano wiązką elektronów z akceleratora w dawce 25 kGy oraz w dawkach wyższych tj. 50, 100, 200, 400 i 800 kGy. W pracy przyjęto zasadę zastosowania jak największej liczby badań przy użyciu metod bezpośrednich, tzn. takich, które nie wymagały żadnej obróbki wstępnej napromieniowanej próbki (np. zmiany stanu skupienia przez rozpuszczanie czy stopnienie), a dopiero w drugiej kolejności zastosowano metody pośrednie, czyli takie, które wymagały rozpuszczania badanych pochodnych azolu i poddawania analizie otrzymanych roztworów.

Z metod bezpośrednich przydatne w badaniach trwałości radiochemicznej pochodnych azolu okazały się zarówno analiza organoleptyczna, jak też metody instrumentalne, szczególnie metoda kalorymetryczna (DSC) i metody spektroskopowe (XRD, EPR, MS), pozwalające ukierunkować dalszy tok badań (Tabela 34).

Natomiast metody pośrednie pozwoliły wykryć, rozdzielić i zidentyfikować powstające produkty radiolizy (TLC, HPLC, HPLC-MS) oraz oznaczyć ubytek zawartości związków wyjściowych (Tabela 35).

Tabela 35. Porównanie efektywności technik bezpośrednich w badaniach trwałości radiochemicznej pochodnych azolu

Metoda	FK	KK	CK	MK
Pomiar masy	-	-	-	-
FT-IR	-	-	-	-
SEM	-	-	-	-
MS	++	++	-/+	+
XRD	++	-	+	+
Analiza organoleptyczna	++	++	-/+	+
DSC	++	+	++	++
EPR	++	++	++	++

-brak zmian -/+ niewielkie zmiany + zmiany ++ zmiany wyraźne

Najmniej informacji na temat zmian zachodzących pod wpływem promieniowania (tzn. brak zmian po napromieniowaniu) dostarczyły takie metody bezpośrednie jak **pomiar masy** oraz metody **SEM** i **FT-IR**.

Analiza wagowa w badaniach trwałości radiochemicznej służy do wstępnego wykrywania lotnych produktów radiolizy. W przypadku pochodnych azolu takie produkty nie powstawały, albo były produktem ubocznym, o niewielkiej masie, poniżej czułości metody (0,02%).

Metodą spektrometrii mas stwierdzono niewielkie zmiany intensywności pików dla niektórych jonów, ale w jednym przypadku (CK napromieniowany dawką 200 kGy) wykryto nowy pik, o wartości m/z odpowiadającej masie cząsteczkowej głównego produktu rozkładu.

Zmiana zabarwienia była obserwowana dla wszystkich związków, lecz jedynie dla FK już po zastosowaniu standardowej dawki sterylizacyjnej, czyli 25 kGy. W przypadku KK zmianę obserwowano po zastosowaniu dawki 50, a dla CK i MK dopiero po napromieniowaniu dawką 400 kGy.

Przyczyną zmiany barwy mogą być następujące procesy fizykochemiczne:

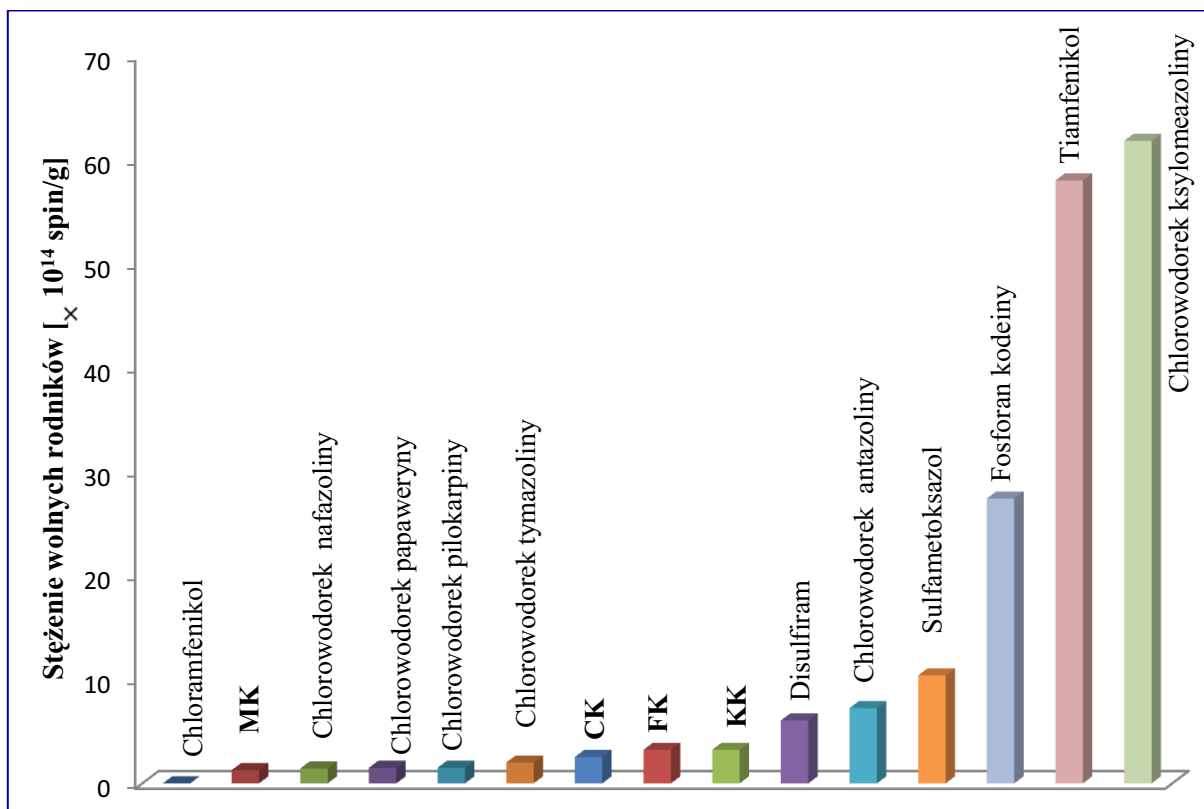
- powstawanie wolnych rodników,
- uszkodzenia sieci krystalicznej przez wybite i spułapkowane jony lub elektrony,
- powstawanie barwnych produktów rozkładu.

W przypadku badanych pochodnych azolu zabarwione po napromieniowaniu próbki stałe dawały po rozpuszczeniu (H_2O , CH_3OH) bezbarwne roztwory, co automatycznie eliminuje powstawanie barwnych produktów radiolizy (lub występują one w ilościach śladowych) i każe zbadać dwie pierwsze możliwości.

I tak dzięki badaniom **EPR** stwierdzono, że w przypadku wszystkich badanych związków powstają wolne rodniki (już przy dawce 25 kGy), lecz w różnym stężeniu. Dla FK i KK obserwowano najwyższy poziom wolnych rodników ($3,23 \times 10^{14}$ spin/g), nieco niższy dla CK ($2,54 \times 10^{14}$ spin/g) i najniższy dla MK ($1,27 \times 10^{14}$ spin/g). Natomiast badania **XRD** wykonane dla FK (200 kGy) wykazały wyraźne zmiany w jego sieci krystalicznej po napromieniowaniu. Wyniki tych badań w połączeniu z faktem, że roztwory napromieniowanych związków były bezbarwne oraz że widma UV-VIS produktów radiolizy nie wykazywały absorpcji w zakresie 400-800 nm wykluczają możliwość powstawania barwnych produktów rozkładu i każą przypuszczać, że przyczyną zmiany barwy napromieniowanych leków należy upatrywać więc w powstawaniu tzw. *centrów barwnych*, nazywanych *centrami F* lub elektronowymi, które absorbują światło z zakresu widzialnego, powodując powstawanie zabarwienia. *Centra F* tworzone są przez luki anionowe, wraz z wychwyconym przez tę lukę elektronem. Bardziej złożone centra pułapkujące elektrony mogą powstać z kilku *centrów F*. Jednocześnie kryształ musi pozostać elektroobojętny, więc tworzeniu elektronowych *centrów barwnych* towarzyszą *centra dziurowe* zwane *centrami V* [142]. W literaturze dość często obserwowano zjawisko zmiany barwy związków po napromieniowaniu *in substantia* i tak jak w przypadku badanych azoli najczęściej przyczyną były defekty sieci krystalicznej i spułapkowane w nich wolne rodniki [31, 33, 38].

Rola wolnych rodników w napromieniowanym leku poza powstawaniem uszkodzeń w sieci krystalicznej nie jest dokładnie określona tzn. mogą prawdopodobnie wpływać na wzrost absorbancji w widmach UV i IR lub przyspieszać reakcje degradacji. Badane pochodne azolu wykazywały poziomy stężenie wolnych rodników po napromieniowaniu typowe dla substancji leczniczych sterylizowanych radiacyjnie (Ryc. 68.), a wydajność radiolityczna ich tworzenia (G_{WR}) wyznaczona w zakresie od $0,81 \times 10^{-4}$ do $2,07 \times 10^{-4}$ spin/100 eV pozwoliła uszeregować badane związki wg wzrastającej wartości G_{WR} następująco:

$$FK_{WR} \geq KK_{WR} > CK_{WR} > MK_{WR}$$



Ryc. 68. Stężenie wolnych rodników w substancjach leczniczych napromieniowanych *in substantia* dawką 25 kGy [32,38,143-145]

Jednakże nie ma żadnych norm farmakopealnych czy zaleceń innych instancji, co do właściwego poziomu wolnych rodników w lekach czy żywności. Można założyć, że wolne rodniki to pośrednie produkty rozkładu związku, lecz nie łatwo określić ich budowę i reaktywność, stąd też niszczycielska rola wolnych rodników może być przeceniana.

Być może dobrym rozwiązaniem dla tej sytuacji byłoby stosowanie czasu karencji dla leków sterylizowanych radiacyjnie, czyli okresu magazynowania po napromieniowaniu, który powaliłby na wygaśnięcie wolnych rodników. W przypadku pochodnych azolu czas ten byłby w granicach 1 roku, z wyjątkiem KK, którego największa cząsteczka i najbardziej złożona budowa przestrzenna jest prawdopodobnie odpowiedzialna za dłuższe utrzymywanie się cząsteczek z niesparowanym elektronem walencyjnym.

Metody pośrednie, czyli badania pochodnych azolu w postaci roztworów wodnych lub metanolowych, pozwoliły na wykrycie, poznanie właściwości oraz ocenę ilościową, a także zaproponowanie struktur produktów radiodegradacji.

Najmniej zmian wykryto metodą **NMR** (Tabela 36.), co jest zrozumiałe, gdyż przesunięcia δ są charakterystyczne dla danego węgla (^{13}C -NMR) czy wodoru (^1H -NMR) i zależne od konformacji cząsteczki, gdzie oddziałują na nie sąsiadujące grupy atomów.

W próbkach napromieniowanych zaledwie niewielka część cząsteczek badanych pochodnych azolu ulegała rozkładowi, tj. powstawały na to miejsce związki potomne, czyli produkty radiolizy. Produkty te w wielu przypadkach tylko nieznacznie różniły się budową od związków macierzystych, często jedną grupą funkcyjną (np. obecnością jednego atomu chlorowca), co powodowało, że na widmie NMR obserwowano niewielkie przesunięcie tylko niektórych sygnałów.

Jednakże metoda ta okazała się bardzo przydatna w ustalaniu struktury produktów rozkładu KK, gdzie dzięki niej wskazano, w której pozycji dochodzi do eliminacji atomu chloru oraz gdzie następuje utlenienie azotu (postanie N-tlenku).

Tabela 36. Przydatność metod pośrednich w badaniach trwałości radiochemicznej pochodnych azolu

Metoda	FK	KK	CK	MK
¹ H-NMR	-/+	-/+	-	-/+
¹³ C-NMR	+	+	+	+
Pomiar pH	++	b.n.	b.n.	b.n.
UV	++	++	++	++
TLC	++	++	++	++
HPLC	++	++	++	++
HPLC-MS	++	++	++	++

-brak zmian -/+ niewielkie zmiany + zmiany ++ zmiany wyraźne b.n. badania niewykonane

Pomiar pH wykonano jedynie dla FK (ze względu na słabą rozpuszczalność w wodzie pozostałych pochodnych). Stwierdzono, że conajmniej jeden z powstających produktów radiolizy musi posiadać właściwości kwasowe, gdyż pH wyraźnie obniżyło się wraz z pochłoniętą przez FK dawką promieniowania (Tabela 15).

Metodą spektrofotometrii UV obserwowano zmiany po napromieniowaniu, jako wzrost absorpcji widma UV (szczególnie przy λ_{\max}), ale ponieważ nie jest to metoda selektywna, więc okazała się przydatna jedynie w przypadku CK, gdzie powstawał produkt radiolizy o λ_{\max} przesuniętym w porównaniu z CK o 25 nm w kierunku fal dłuższych.

Metody chromatograficzne TLC jak i HPLC charakteryzujące się różną czułością, pozwoliły wykryć produkty radiodegradacji. Najczulsza była metoda HPLC z detektorem MS, dzięki której wykryto nawet 11 produktów rozkładu w przypadku MK (Tabela 37).

Tabela 37. Porównanie liczby produktów radiolizy pochodnych azolu

Symbol związku	Liczba produktów			
	TLC	HPLC	HPLC-MS	
			wszystkie	zidentyfikowane
CK	3	3	4	2
KK	3	2	5	4
FK	2	3	5	5
MK	2	4	11	7

Z kolei widma CID pozwoliły na zaproponowanie wzorów sumarycznych i strukturalnych produktów radiodegradacji badanych związków.

W Tabeli 38. Zestawiono natomiast najważniejsze zmiany zachodzące w badanych związkach po napromieniowaniu standardową dawką sterylizacyjną (25 kGy) oraz najwyższą.

Jak wynika z przedstawionego zestawienia po napromieniowaniu standardową dawką sterylizacyjną tylko jeden z badanych związków, a mianowicie FK, nie spełniał wymagań farmakopealnych (zmiana koloru) i należy wykluczyć możliwość wyjąławiania FK metodą radiacyjną za pomocą wiązki wysokoenergetycznych elektronów.

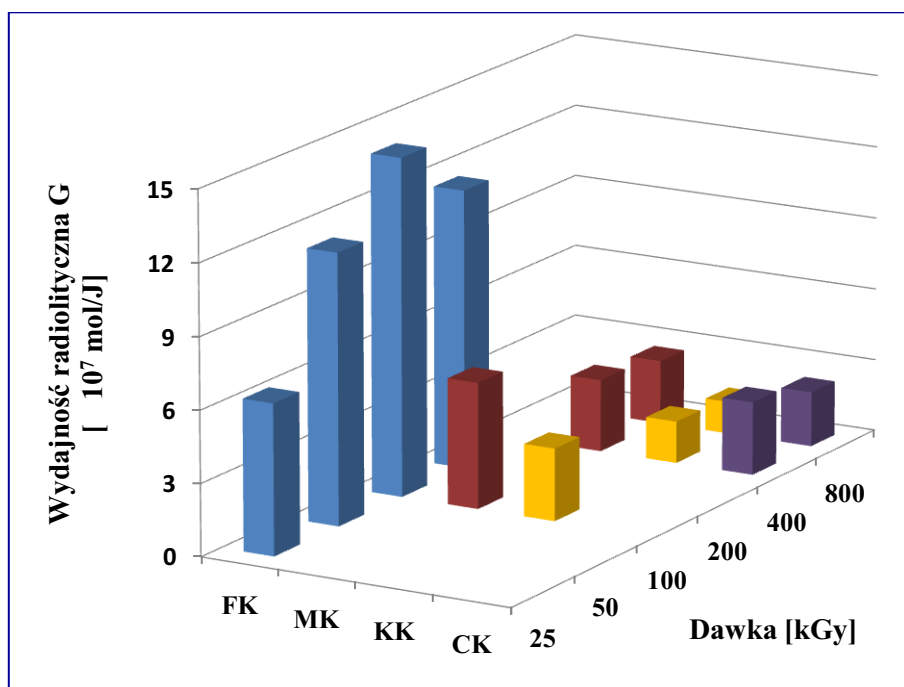
Pozostałe związki spełniały wymagania farmakopealne, tzn. ich barwa pozostawała bez zmian, wyznaczony metodą HPLC ubytek zawartości mieścił się w zakresie 0,0 - 0,6%. Jedyne stwierdzone zmiany to obecność wolnych rodników i wzrost absorbancji promieniowania UV przy λ_{\max} o 4,5-7,5%. W takich przypadkach zalecana jest walidacja dawki, tzn. ustalenie skutecznej dawki sterylizacyjnej, która może być niższa niż 25 kGy. Wobec powyższego droga do sterylizacji FK metodą radiacyjną nie jest definitywnie zamknięta.

Na podstawie wyników oznaczania zawartości badanych pochodnych po napromieniowaniu, uzyskanych metodą HPLC (Tabela 30), obliczono **wydajność radiolityczną** badanych związków, czyli ilość cząsteczek, która ulegała rozkładowi po zaabsorbowaniu 100 eV energii w postaci promieniowania jonizującego. A zatem współczynnik ten wyraża podatność związku na rozkład pod wpływem energii promieniowania jonizującego. Uzyskane wartości G zestawiono w Tabeli 31. oraz przedstawiono na Ryc. 58 i 69.

Tabela 38. Zestawienie najważniejszych zmian pochodnych azolu po napromieniowaniu standardową dawką sterylizacyjną oraz najwyższą

Symbol związku	Badany parametr		Obserwowane zmiany	
			25 kGy	800 kGy
MK	Barwa związku		biały	żółtawy
	Ubytek zawartości ^a		0%	10,4%
	Liczba produktów radiolizy	TLC	0	2
		HPLC	0	4
		HPLC-MS	-	11
Inne		obniżenie temp. top. o 1,8°C stęż. wolnych rodników $1,27 \times 10^{14}$ spin/g	obniżenie temp. top. o 3,8°C* wzrost absorpcji UV przy λ_{\max} o 69,4% $\Delta \delta$ przy C5 -0,13 ppm**	
KK	Barwa związku		biały	brązowy
	Ubytek zawartości ^a		0,6%	5,7%
	Liczba produktów radiolizy	TLC	0	3
		HPLC	0	2
		HPLC-MS	-	5
Inne		stęż. wolnych rodników $3,23 \times 10^{14}$ spin/g wzrost absorpcji UV przy λ_{\max} o 4,5%	obniżenie temp. top. o 1,2°C* wzrost absorpcji UV przy λ_{\max} o 22,4% $\Delta \delta$ przy C32 -0,99 ppm**	
CK	Barwa związku		biały	kremowy
	Ubytek zawartości ^a		0%	6,3%
	Liczba produktów radiolizy	TLC	0	3
		HPLC	1 (ślady)	3
		HPLC-MS	-	4
Inne		stęż. wolnych rodników $2,54 \times 10^{14}$ spin/g wzrost absorpcji UV przy λ_{\max} o 7,5%	nowy jon w widmie MS $m/z=308^*$ obniżenie temp. top. o 2,2°C* $\Delta \delta$ przy C2 +0,05 ppm** wzrost absorpcji UV przy λ_{\max} o 36,3%	
FK	Barwa związku		kremowy	brązowy
	Ubytek zawartości ^a		0,5%	7,1%*
	Liczba produktów radiolizy	TLC	0	2*
		HPLC	0	3*
		HPLC-MS	-	5
Inne		obniżenie wartości pH o 0,03 stęż. wolnych rodników $3,23 \times 10^{14}$ spin/g wzrost absorpcji UV przy λ_{\max} o 4,9% obniżenie temp. top. o 0,8°C	obniżenie wartości pH o 0,97* zmiany w widmie XRD* wzrost absorpcji UV przy λ_{\max} o 37,9%* $\Delta \delta$ przy C2 -0,36 ppm** obniżenie temp. top. o 2,3°C*	

* 200 kGy **400 kGy ^a- wyznaczony metodą HPLC



Ryc. 69. Wydajność radiolityczna badanych pochodnych azolu

Otrzymane wartości G dla pochodnych azolu mieściły się w zakresie od 1,34 do 14,07 $\times 10^7$ mol/J o były że są tego samego rzędu wielkości co wartości wydajności radiolitycznej innych związków leczniczych poddawanych napromieniowaniu w fazie stałej [33,36,145].

Najwyższe wartości wydajności radiolitycznej uzyskano dla FK, a szereg trwałości radiochemicznej wg tego parametru (uwzględniając wynik osiągnięty dla najwyższej dawki promieniowania) jest następujący:

$$\mathbf{KK > CK > MK > FK}$$

W przypadku FK najwyższa wydajność radiolityczna rozkładu związku G jest zgodna z najwyższą wartością G_{WR} wśród badanych pochodnych azolu. Dla tej pochodnej stwierdzono także najpierw wzrost (do dawki 100 kGy), a następnie spadek wartości G względem dawki (Ryc. 69). Dla pozostałych pochodnych azolu obserwowano spadek wartości G wraz ze wzrostem dawki promieniowania. Zmiany G od dawki promieniowania należy tłumaczyć mniejszym lub większym udziałem absorbowanej energii we wtórnych reakcjach radiolizy, tj. powstawaniu wtórnych wolnych rodników i wtórnych produktów rozkładu oraz destrukcyjnym wpływem na strukturę krystaliczną napromieniowywanych

związków. Zarówno wzrost jak i spadek wartości wydajności radiolitycznej od dawki promieniowania był opisywany w literaturze także dla innych związków leczniczych poddawanych napromienianiu [145-147].

W przypadku niniejszej pracy czas napromieniowywania badanych pochodnych azolu wiązką elektronów był bardzo krótki, ponieważ moc źródła wynosiła 10 kGy/s, a więc dawka 25 kGy była absorbowana w czasie 2,5 s; dawka 100 kGy w czasie 10 s, 400 kGy w 40 s, a 800 kGy odpowiednio w 80 s. Znając czas napromieniowywania oraz spadek zawartości po napromienianiu wyznaczono **równania kinetyczne reakcji radiodegradacji** badanych pochodnych azolu, a następnie ich parametry kinetyczne, tj.: stałą szybkości rozkładu (k) oraz czas 10% ubytku związku napromieniowanego ($t_{0,1}$) oraz odpowiadającą mu dawkę promieniowania ($D_{0,1}$) - Tabela 39.

Tabela 39. Zestawienie parametrów kinetycznych badanych pochodnych azolu

Parametr kinetyczny	FK	MK	CK	KK
$k \times 10^3 [s^{-1}]$	0,31	0,13	0,09	0,07
$t_{0,1} [s]$	34,34	78,26	119,23	149,50
$D_{0,1} [kGy]$	343,41	782,60	1192,26	1495,03

W badanym zakresie dawek proces rozkładu radiolitycznego pochodnych azolu był zgodny z kinetyką reakcji I rzędu. Należy jednak zaznaczyć, że był to tylko pierwszy etap rozkładu, podczas którego ubytek zawartości wyjściowej obniżył się o ~ 10%.

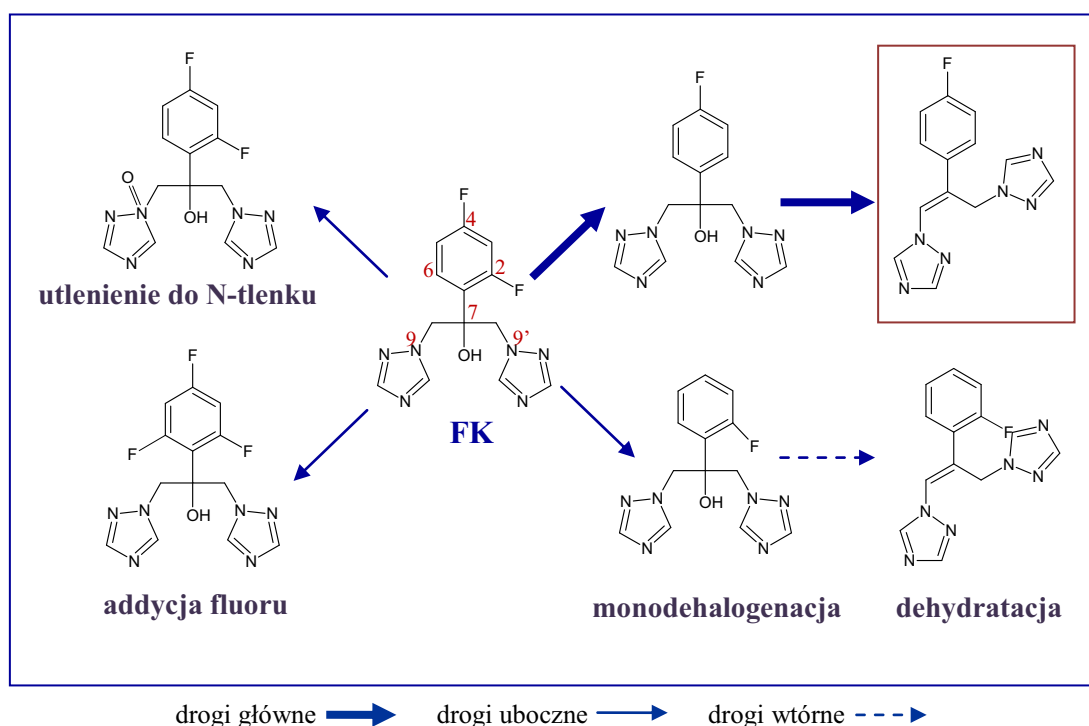
Otrzymane wartości k sugerują, że najbardziej odporną pochodną azolu na promieniowanie jonizujące w zakresie analizowanych dawek o działaniu przeciwgrzybiczym jest KK, natomiast najmniej trwałą FK. Różnice w szybkości radiodegradacji są niewielkie: KK ulega rozkładowi tylko ~4 razy wolniej od FK, a szereg trwałości radiochemicznej badanych związków przedstawia się następująco:

$$\mathbf{KK > CK > MK > FK}$$

Szereg ten zaprzecza tezie o destrukcyjnym działaniu wolnych rodników, których stężenie było identyczne właśnie w przypadku KK i FK. Tak więc nie można jednoznacznie kwalifikować obecności wolnych rodników jako czynnika przyspieszającego destrukcję związku (przynajmniej w obrębie badanych pochodnych).

Zastosowanie metody HPLC-MS pozwoliło na zaproponowanie struktury produktów rozkładu radiolitycznego badanych pochodnych azolu. Dla poszczególnych pochodnych stwierdzono powstawanie od 4 (CK) do 11 (MK) produktów radiolizy (łącznie 25). Dla większości z nich (tj. 19) udało się zaproponować wzory strukturalne (Tabele 31-33 oraz 36).

W przypadku FK poznano budowę wszystkich pięciu produktów radiolizy, ustalono że powstają one na drodze eliminacji atomu fluoru z pierścienia benzenowego przy C4 i C2 (powstawanie monofluoropochodnych FK), ale także addycji atomu fluoru przy C6, co prowadzi do powstawania trifluoropochodnej FK. Zaobserwowano także tworzenie się N-tlenków poprzez utlenienie atomów azotu przy N9 lub N9' oraz tworzenie się innych produktów utlenienia poprzez oderwanie grupy hydroksylowej i odwodornienie wiązania C7-C8 (FK-H₂O). Na Ryc. 70. przedstawiono drogi powstawania produktów radiolizy FK.



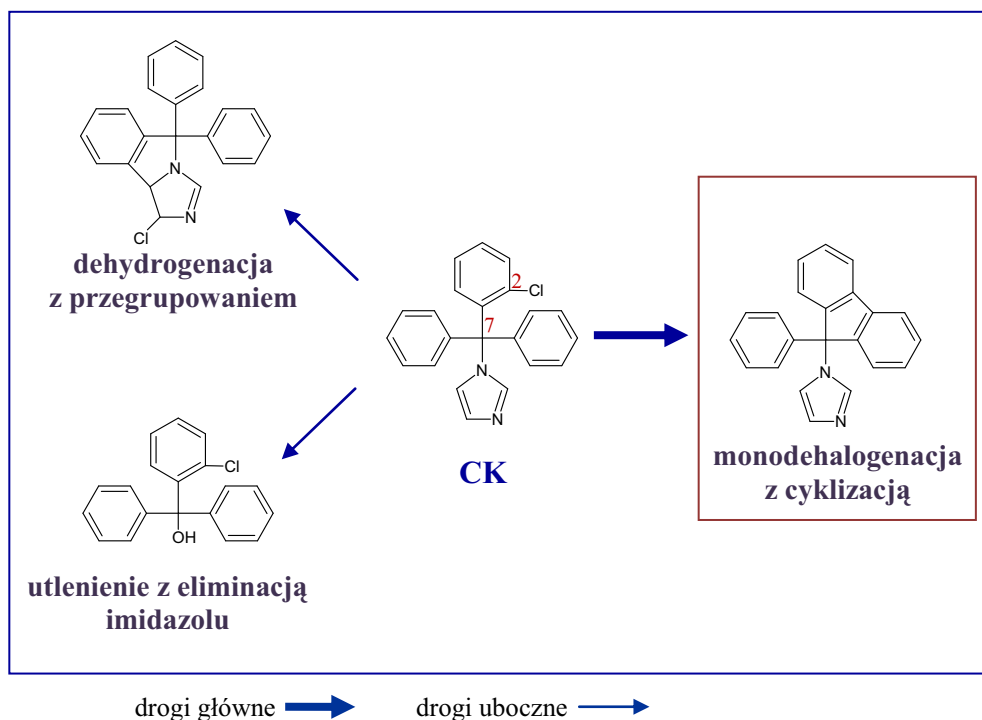
Ryc. 70. Schemat procesów odpowiedzialnych za tworzenie się produktów radiolizy FK

Utlenienie, dehydratacja i dehalogenacja związków po napromieniowaniu jest często opisywana w literaturze [24-26,33,35,39,143-145]. Obserwowano także tworzenie się produktów radiolizy o większej liczbie atomów chlorowca niż związek wyjściowy (np. powstawanie z monochloropochodnej dichloropochodnej) [144,145]. Potwierdza to rodnikowy charakter zmian zachodzących w napromieniowanym leku i rolę rodników halogenków (w przypadku FK rodników F[•]).

W widmie ^{13}C -NMR wykonanym dla FK po napromieniowaniu największe zmiany przesunięcia δ obserwowano dla węgla C2 i C4 co może być, na równi z wielkością pików na chromatogramie HPLC (Ryc. 59), potwierdzeniem faktu tworzenia się monofluoropochodnych FK oraz że droga na której powstają, tzn. reakcja dehalogenacji, jest głównym procesem odpowiedzialnym za rozkład radiolityczny FK.

Jest także wielce prawdopodobne, że pośrednim potwierdzeniem tworzenia się pochodnych z dodatkowymi wiązaniami podwójnymi, czyli pochodnych N-tlenkowych i dehidropochodnej, był wzrost absorpcji przy λ_{max} obserwowany w widmie UV [148].

Po napromieniowaniu drugiej z badanych pochodnych azolu w stanie stałym, czyli CK wiązką elektronów powstaje jeden główny produkt radiolizy na drodze eliminacji cząsteczki chlorowodoru i utworzenia dodatkowego pierścienia, czyli układu fluorenu – Ryc. 71.



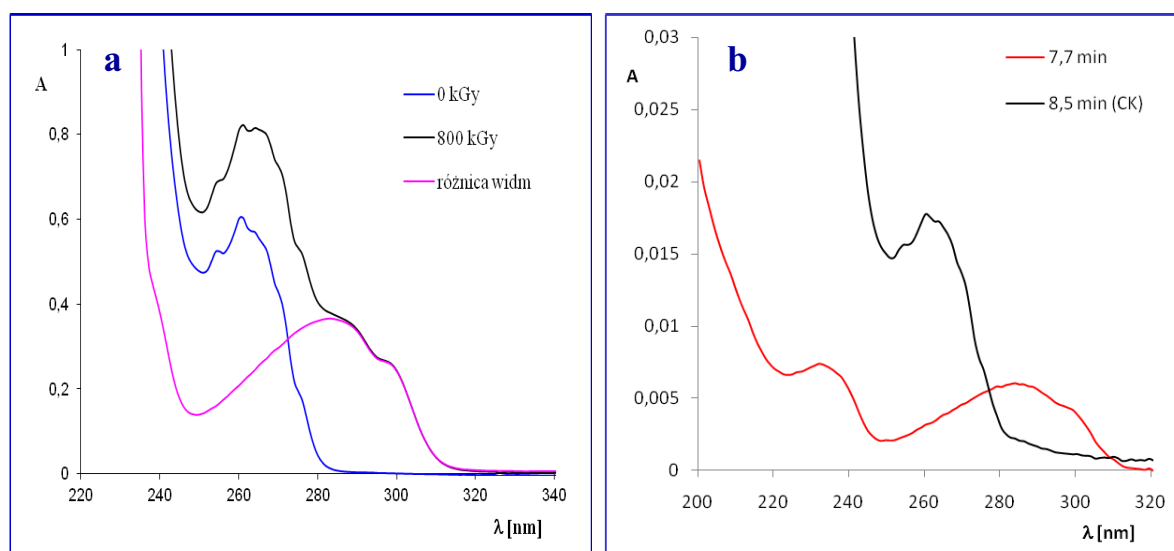
Ryc. 71. Schemat procesów odpowiedzialnych za tworzenie się produktów radiolizy CK

Oprócz wyników dostarczonych metodą HPLC-MS strukturę głównego produktu radiolizy CK potwierdzają wyniki analizy MS i NMR (Ryc. 37., Tabela 15. i Tabela 25.), pośrednio także analiza spektrofotometryczna UV bezpośrednia jak i po rozdziale chromatograficznym HPLC. W widmie MS wykreślonym w warunkach standardowych dla CK po napromieniowaniu dawką 200 kGy zaobserwowano nowy pik o intensywności względnej 1,4% przy m/z 308, czyli odpowiadający wartości masie cząsteczkowej kationorodnika

1-(9-fenylofluoren-9-ylo)-imidazolu oraz stwierdzono brak charakterystycznego piku izotopowego świadczący o nieobecności atomu chloru w strukturze produktu

Porównując widma ^{13}C -NMR wykonane dla CK przed i po napromieniowaniu dawką 400 kGy obserwowano jedynie zmianę przesunięcia δ sygnału C2, co potwierdza fakt, że część cząsteczek CK po napromieniowaniu ma inne sąsiedztwo przy węglu C2, przy nim bowiem następuje dehalogenacja i cyklizacja związku.

Pochodne fluorenowe mają charakterystyczny silny chromofor absorbujący promieniowanie nadfioletowe powyżej 250-320 nm, dlatego też w widmie UV dla CK po napromieniowaniu obserwuje się wyraźny wzrost absorpcji, oraz pojawienie się pasma z maksimum absorpcji przy ok. 283 nm (Ryc. 72 a). Po rozdziale chromatograficznym (HPLC) oraz dzięki widmom uzyskanym z detektora DAD okazało się, iż za różnicę przebiegu widm UV jest odpowiedzialny główny produkt radiolizy o $t_R = 7,7$ min (Ryc. 72 b).



Ryc. 72. Porównanie widm UV dla CK i jego głównego produktu radiodegradacji

a. widma UV przed rozdzieleniem

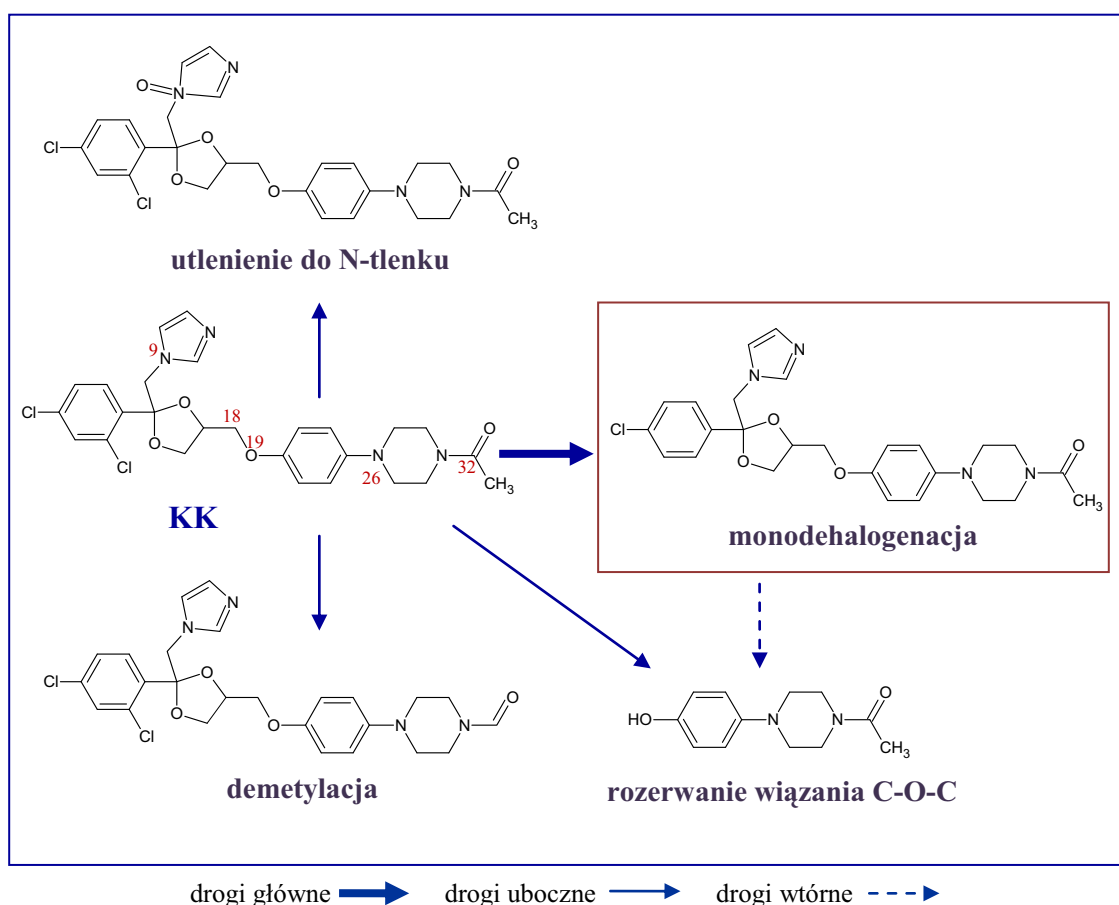
b. widma UV po rozdziale HPLC

Jest to 1-(9-fenylofluoren-9-ylo)-imidazol, czyli pochodna fluorenowa, będąca przedstawicielem wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych (WWA, lub PAH z ang. *Polycyclic Aromatic Hydrocarbons*) i może wykazywać szkodliwe działanie kancerogenne. Należałoby zatem określić jej właściwości toksyczne [24].

Pozostałe dwa produkty radiolizy CK powstają w ilościach śladowych. Stwierdzono, że są to (2-chlorofenylo)-difenylometanolu i pochodnej fluorenu niepozbawionej atomu chloru, czyli dehydrogenopochodnej CK, której hipotetyczną strukturę przedstawia Ryc. 71.

W przypadku trzeciej badanej pochodnej, czyli KK, który posiada największą i najbardziej skomplikowaną cząsteczkę, ustalono następujące drogi radiodegradacji: demetylację, dehalogenację, rozerwanie mostka tlenowego w cząsteczce i utlenienie. Zobrazowano to na Ryc. 73.

Metodą HPLC-MS nie rozstrzygnięto czy tworzy się monochloropochodna KK z atomem Cl w pozycji para czy orto pierścienia benzenowego. O tym, iż z większym prawdopodobieństwem zachodzi eliminacja atomu chloru w pozycji C4 świadczy wynik analizy ^{13}C -NMR porównując bowiem widma KK przed i po napromieniowaniu dawką 400 kGy stwierdzono znaczne rozbieżności przesunięć δ odpowiadające sygnałowi węgla C4, zaś niewielkie (w granicach błędów metody) zmiany dla sygnału węgla C2.

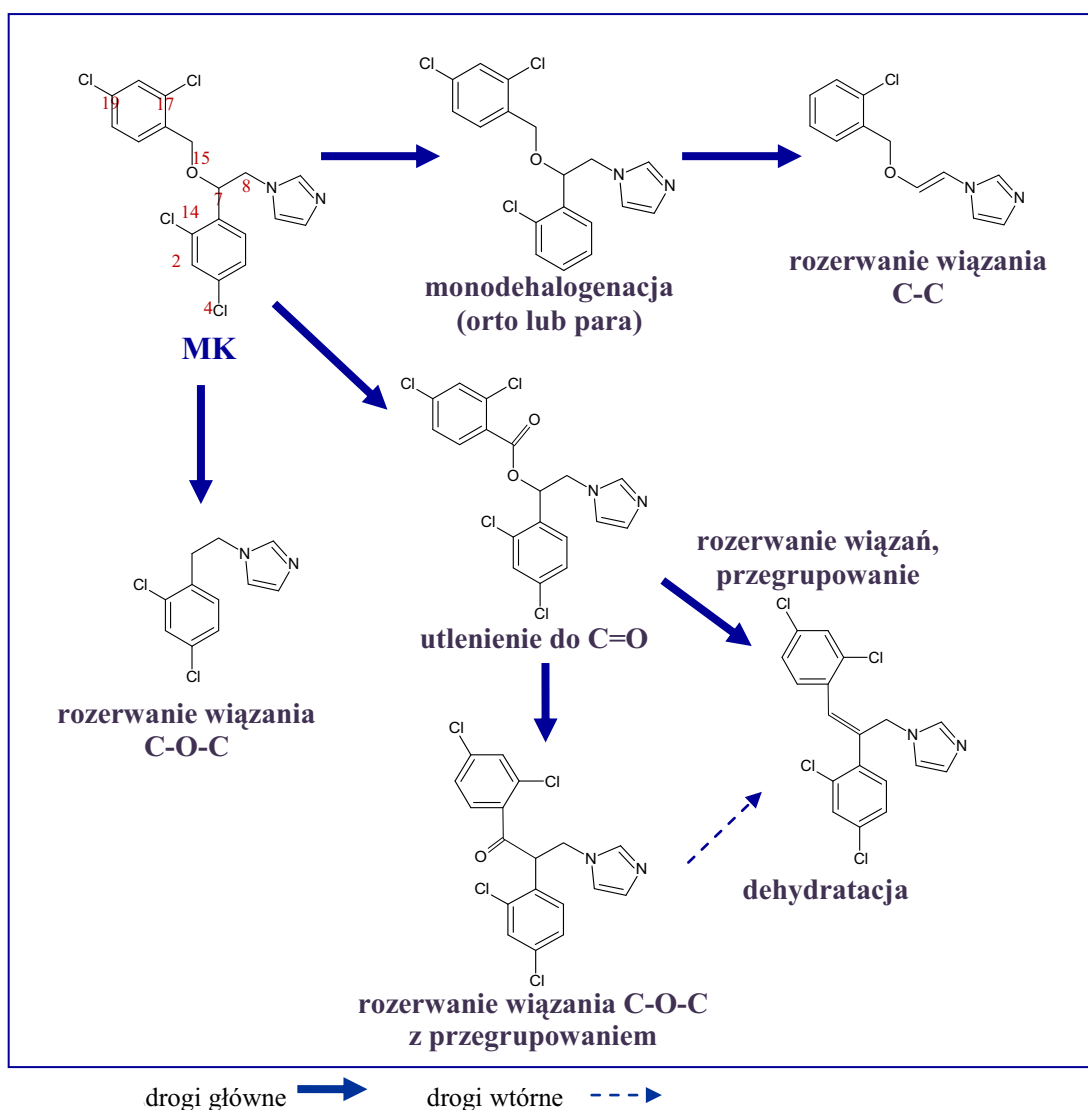


Ryc. 73. Schemat procesów odpowiedzialnych za tworzenie się produktów radiolizy KK

W przypadku tworzenia się N-tlenku KK także dzięki metodzie NMR rozstrzygnięto, iż z większym prawdopodobieństwem utleni się azot w N9 w pierścieniu imidazolu niż N26 w pierścieniu piperazyny. Analizując widma ^{13}C -NMR KK przed i po napromieniowaniu zanotowano także bardzo wyraźną zmianę dla sygnału odpowiadającemu atomowi węgla C32, co potwierdza, że pewna część napromieniowanych cząsteczek ulega demetylacji, co

całkowicie zmienia konformację i w konsekwencji przesuwają w kierunku niższych wartości ppm sygnał węgla C32. Za wzrost absorpcji w widmie UV KK po napromieniowaniu tak jak w przypadku FK może być odpowiedzialny produkt radiolizy o charakterze N-tlenku, gdyż posiada układ chromoforowy silniej absorbujący promieniowanie UV niż związek macierzysty [148].

Dla czwartej badanej pochodnej, MK, wykryto po napromieniowaniu najwięcej, bo aż 11 produktów radiodegradacji. Nie wszystkie niestety udało się zidentyfikować. Większość z tych związków powstawała w ilościach śladowych, a suma ich zawartości po napromieniowaniu dawką 400 kGy i 800 kGy stanowiła odpowiednio ~6% i 10 %. Procesy, w których powstają produkty radiolizy MK przedstawiono na Ryc. 74. Natomiast w Tabeli 40. porównano wspólne i specyficzne dla poszczególnych pochodnych reakcje radiodegradacji.



Ryc. 74. Schemat procesów odpowiedzialnych za tworzenie się produktów radiolizy MK

Żaden z produktów radiolizy MK nie dominował, co może wskazywać, że w przypadku tej pochodnej rozkład zachodzi wielokierunkowo. Chociaż w cząsteczce MK znajdują się aż cztery atomy chloru, to tak jak w przypadku innych badanych azoli eliminacja atomu halogenku zachodzi jednostopniowo, tzn. wykryto trichloropochodne MK (= monodechloropochodne MK-Cl), zaś monochloro- oraz dichloropochodne powstają dopiero w wyniku rozerwania szkieletu cząsteczki.

W wyniku zastosowania metody HPLC wykryto łącznie dla wszystkich pochodnych azolu 25 produktów radiodegradacji, z czego dla 19-tu zaproponowano najbardziej prawdopodobne struktury.

Wspólną reakcją radiodegradacji w badanej grupie azoli jest reakcja eliminacji chlorowca. W przypadku CK struktura przestrzenna związku przesądziła o dodatkowej cyklizacji dechloropochodnej. Dla FK i KK zaobserwowano produkty rozkładu powstające w wyniku utlenienia azotu w pierścieniu azolowym (triazolowym - FK, imidazolowym - KK), czyli powstawanie N-tlenków.

Natomiast pozostałe produkty rozkładu powstawały w odmiennych dla każdego związku reakcjach: dehydratacji, utlenienia, rozerwania wiązań C-C i C-O-C oraz przegrupowań.

Tabela 40. Porównanie reakcji radiodegradacji badanych pochodnych

Rodzaj reakcji	FK	KK	MK	CK
Dehalogenacja	dehalogenacja mono	dehalogenacja mono	dehalogenacja mono	dehalogenacja z cyklizacją
Utlenianie	utlenienie do N=O – dehydratacja	utlenienie do N=O rozerwanie mostka tlenowego –	utlenienie przy C15 z przegrupowaniem rozerwanie mostka tlenowego dehydratacja	utlenienie przy C7 – –
Inne	addycja F	demetylacja	oderwanie pierścienia dichlorofenyloвого	oderwanie pierścienia imidazolu
Główny produkt radiolizy	Monofluoro pochodna	Monochloro pochodna	Brak produktu głównego	Pochodna fluorenu

Reasumując, przeprowadzone badania dostarczyły informacji na temat trwałości radiochemicznej badanych związków, tj. FK, CK, KK i MK w fazie stałej (Tabela 41.), dla których nie było dotychczas w literaturze doniesień o wpływie promieniowania jonizującego na ich trwałość, ani w fazie stałej ani w roztworach.

Tabela 41. Szeregi trwałości radiochemicznej pochodnych azolu

Kryterium	Szereg trwałości pochodnych azolu
Wydajność radiolityczna generowania wolnych rodników (G_{WR})*	MK > CK > KK ≥ FK
Wydajność radiolityczna procesu radiolizy**	KK > CK > MK > FK
Stała szybkości radiolizy**	KK > CK > MK > FK

* dla dawki 25 kGy ** dla najwyższej zastosowanej dawki czyli 800 kGy (FK 400 kGy)

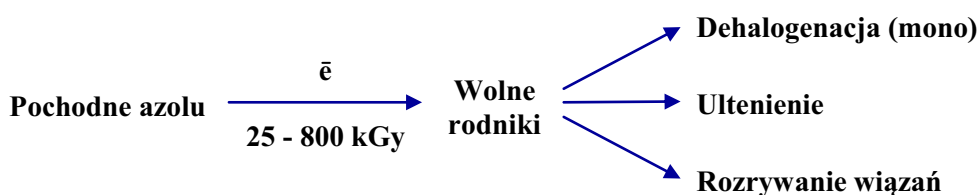
We wszystkich trzech szeregach FK okazał się najbardziej nietrwałą pochodną azolu na promieniowanie jonizujące w postaci wiązki elektronów w fazie stałej.

Kolejne pochodne w szeregach trwałości ułożone są różnie w zależności od parametru analizy, nie ma w tym sprzeczności, ponieważ wydajność rozkładu związków do wolnych rodników jest jedynie pierwszym etapem rozkładu i nie przesądza o całkowitym rozkładzie radiolitycznym związku. Tak więc w przypadku KK i FK powstaje najwięcej wolnych rodników, lecz nie przyspiesza to dalszego rozkładu cząsteczki do trwałych produktów radiodegradacji w przypadku KK, a przyspiesza dla FK.

Dlatego drugą pochodną azolu pod względem wrażliwości na promieniowanie jonizujące w tych badaniach okazał się MK, trzecią CK a za najbardziej trwałą związek uznano KK.

6. Wnioski

1. Promieniowanie jonizujące niezależnie od dawki powoduje powstawanie w badanych pochodnych azolu (flukonazolu FK, ketokonazolu KK, klotrymazolu CK i azotanu mikonazolu MK) wolnych rodników w różnym stężeniu i o różnej długości życia.
2. W zależności od dawki promieniowania badane pochodne w stanie stałym wykazują powstawanie zabarwienia (spułąpkowane wolne rodniki) i występowanie bezbarwnych produktów radiolizy.
3. Proces radiodegradacji w zakresie dawek 25 - 800 kGy przebiega zgodnie z kinetyką reakcji pierwszego rzędu: najszybciej dla FK ($k = 0,31 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$), najwolniej zaś dla KK ($k = 0,07 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$).
4. Wydajność radiolityczna badanych pochodnych azolu jest najwyższa w przypadku FK, a najniższa dla KK. Natomiast wydajność radiolityczna tworzenia się wolnych rodników jest rzędu 10^{-8} - 10^{-9} spin/100 eV.
5. Z przebadanych czterech pochodnych FK, CK, KK i MK tylko jedna: FK nie będzie mogła być sterylizowana radiacyjnie, co może sugerować, że obecność atomów fluoru w cząsteczce obniża trwałość radiochemiczną w tej grupie związków.
6. Identyfikacja 19 produktów radiolizy pozwoliła na zaproponowanie uproszczonego schematu radiodegradacji tej grupy związków i stwierdzenie, że o trwałości radiochemicznej badanych pochodnych azolu w stanie stałym decyduje przede wszystkim ich dehalogenacja, a w następnej kolejności utlenianie do N-tlenków lub w wyniku odwodornienia (dehydrogenacja) wiązań oraz rozerwanie wiązań C-O-C i C-C.



7. Streszczenie

Badania trwałości radiochemicznej czterech pochodnych azolu o działaniu przeciwgrzybiczym (flukonazolu - FK, ketokonazolu - KK, klotrymazolu - CK i azotanu mikonazolu - MK) przeprowadzono w fazie stałej w celu określenia możliwości zastosowania sterylizacji radiacyjnej do ich wyjaławiania oraz poznania trwałości radiochemicznej łącznie z procesami odpowiedzialnymi za przebieg, szybkość i mechanizm radiodegradacji.

Badane związki poddano ekspozycji promieniowaniem jonizującym w postaci wiązek wysokoenergetycznych elektronów w dawce 25 kGy, czyli w dawce standardowo stosowanej w sterylizacji radiacyjnej oraz w dawkach wyższych (50 – 800 kGy), co miało na celu nasilenie procesu rozkładu, a tym samym ułatwienie jego badania.

Na podstawie przeprowadzonych badań z wykorzystaniem metod organoleptycznych, spektroskopowych (UV, FT-IR, $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$, EPR, XRD, MS), chromatograficznych (TLC, HPLC, HPLC-MS) oraz kalorymetrycznych (DSC) stwierdzono zmiany właściwości fizykochemicznych we wszystkich napromieniowanych pochodnych azolu, nasilające się wraz ze wzrostem dawki promieniowania.

Wśród obserwowanych zmian nie stwierdzono zmian w krystaliczności badanych związków, przebiegu widm FT-IR, nie obserwowano również powstawania lotnych ani barwnych produktów radiodegradacji, a powstające zabarwienie związków napromieniowanych powstawało na skutek tworzenia centrów barwnych ze spułapkowanymi wolnymi rodnikami.

W wyniku przeprowadzonych badań ustalono, że badane pochodne azolu różnią się wydajnością radiolityczną (G) zarówno sumarycznego procesu radiodegradacji (1,29 - 13,57 cząsteczek/100 eV) jak też wydajnością radiolityczną powstawania wolnych rodników ($0,81 - 2,07 \times 10^{-4}$ spin/100 eV) oraz trwałością radiochemiczną (KK > CK > MK > FK), natomiast nie różnią się charakterem kinetycznym sumarycznego procesu rozkładu.

Na podstawie przeprowadzonych badań kinetycznych wykazano, że proces radiodegradacji w przypadku każdej badanej pochodnej zachodzi zgodnie z kinetyką reakcji pierwszego rzędu, a obliczone stałe szybkości mieszczą się w granicach od $0,07 \times 10^3 \text{ s}^{-1}$ (KK) do $0,31 \times 10^3 \text{ s}^{-1}$ (FK). Ich wielkość decyduje o najmniejszej trwałości FK, który ulega radiodegradacji 4 razy szybciej niż najbardziej trwałe KK.

W wyniku zidentyfikowania 19 z 25 wykrytych i rozdzielonych produktów radiolizy ustalono mechanizm radiodegradacji badanych pochodnych azolu w stanie stałym, który przebiega w wyniku 3 reakcji wspólnych dla wszystkich badanych związków tj.:

- dehalogenacji (eliminacja atomu F w przypadku FK lub atomu Cl w pozostałych przypadkach)
- utlenienia (m. in. prowadzącego od powstania N-tlenków w przypadku FK i KK),
- rozerwania wiązań C-C i C-O-C

oraz reakcji specyficznych dla poszczególnych pochodnych takich jak cyklizacja i oderwanie pierścienia azolu (CK), dehydratacja (FK), demetylacja (KK) lub oderwanie pierścienia dichlorofenyłowego (MK).

Głównym produktem radiolizy w przypadku FK i KK były monohalogenopochodne (odpowiednio: 1,1'-[(2-(4-fluorofenylo)prop-1-ene-1,3-dilo]bis(1H-1,2,4-triazol) i 1-[4-[4-[[2-(4-chlorofenylo)-2-(imidazol-1-ylometylo)-1,3-dioksołan-4-ylo]metoksy]fenylo]-piperazyn-1-ylo]etanon) a w przypadku CK pochodna fluorenu (1-(9-fenylo-9H-fluoren-9-ylo)-1H-imidazol) powstająca w procesie dehalogenacji z cyklizacją. Natomiast w przypadku MK nie można jednoznacznie wskazać produktu głównego, ponieważ radioliza przebiega zbyt wielokierunkowo (11 produktów rozkładu). Należy jednakże przypuszczać, że pękanie mostka tlenowego lub oderwanie podstawnika dichlorofenyłowego odgrywa tu równie ważną rolę jak reakcja dehalogenacji.

Przeprowadzone badania wykazały, że trzy z badanych pochodnych (**CK, KK i MK**) wykazują odpowiednią trwałość radiochemiczną w zakresie dawki standardowo stosowanej w sterylizacji radiacyjnej i **będą mogły być wyjaławiane metodą radiacyjną** z użyciem wiązki wysokoenergetycznych elektronów. Natomiast dla FK, który charakteryzuje się najmniejszą trwałością radiochemiczną w grupie badanych leków, nie będzie można zastosować tej metody, lecz niewykluczone, że w jego przypadku będzie można zastosować metodę radiacyjną z wykorzystaniem promieniowania gamma.

Najbardziej przydatne do badań nad trwałością radiochemiczną pochodnych azolu w stanie stałym okazały się niektóre bezpośrednie metody instrumentalne (EPR i DSC), a z metod pośrednich metody chromatograficzne, szczególnie HPLC-MS oraz ¹³C-NMR. Najmniej wiadomości o zmianach zachodzących pod wpływem napromieniowania dostarczyła metoda FT-IR, SEM i ¹H-NMR.

Summary

Radiochemical stability of azole derivatives of antimycotic activity

Radiochemical stability of four azole derivatives of antimycotic activity (flukonazole - FK, ketokonazole - KK, clotrimazole - CK and myconazole nitrate - MK) in solid phase was studied to determine the possibility of their sterilisation by irradiation and to identify the processes responsible for the character, rate and mechanism of radiodegradation. The compounds studied were exposed to ionising radiation emitted by high energy electron beam in the dose of 25 kGy which is usually used for sterilisation and in higher doses (50 – 800 kGy) to enhance the process of degradation to make it easier to examine.

The degradation was examined by the organoleptic observation, spectroscopic methods (UV, FT-IR, $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$, EPR, XRD, MS), chromatographic methods (TLC, HPLC, HPLC-MS) and thermal method (DSC). Upon irradiation changes were observed in the physico-chemical properties of all irradiated azole derivatives and their intensity increased with the irradiation dose. No changes were noted in the crystallinity of the compounds and in their FT-IR spectra. No volatile or colourful products of radiodegradation were found and the colour changes were a result of formation of colour centres of trapped radicals. The azole derivatives studied differed in the radiolytic yield (G) of the total process of radiodegradation (1.29-13.57 molecules/100 eV), in the radiolytic yield of free radical formation ($0.81\text{-}2.07 \times 10^{-4}$ spin/100 eV) and in radiochemical stability (KK > CK > MK > FK), but no differences were found in the kinetic character of the total degradation. The processes of radiodegradation of all derivatives studied were characterised by the first order kinetics and the rate constants varying from $0.07 \times 10^3 \text{ s}^{-1}$ (KK) to $0.31 \times 10^3 \text{ s}^{-1}$ (FK). As follows FK shows the lowest stability and undergoes radiodegradation 4 times faster than the most stable KK. Identification of 19 out of 25 detected and separated products of radiolysis of the derivatives studied in solid phase permitted concluding that the mechanism of radiodegradation involved the following three reactions taking place for each derivative:

- dehalogenation (elimination of F atom in FK and Cl atom in the other derivatives)
- oxidation (leading to formation of N-oxides in FK and KK),
- cleavage of C-C and C-O-C bonds,

and a few reactions specific of individual derivatives such as cyclisation and azole ring elimination (CK), dehydration (FK), demethylation (KK) and dichlorophenyl ring elimination (MK). The main products of radiolysis of FK and KK were monohalogen derivatives (1,1'-[(2-(4-fluorophenyl)prop-1-ene-1,3-diyl]bis(1H-1,2,4-triazole) and 1-[4-[4-[[2-(4-chlorophenyl)-2-(-1H-imidazol-1-ylomethyl)-1,3-dioxolan-4-yl]metoxy]phenyl]piperazin-1-yl]ethanon, respectively), while the main product of CK radiolysis was a fluorene derivative (1-(9-phenyl-9H-fluoren-9-yl)-1H-imidazole) formed in dehalogenation with cyclisation. In degradation of MK no main product could be indicated as its radiolysis was multidirectional and gave 11 products, however, it is supposed that cleavage of the oxygen bridge or abstraction of the dichlorophenyl substituent plays as equally important role as the reaction of dehalogenation.

Results of the study have shown that three of the four derivatives, **CK, KK and MK** are radiochemically stable upon irradiation with the dose usually used for sterilisation and **can be sterilised by irradiation** with the ionic radiation emitted by high-energy electrons. FK, characterised by the lowest radiochemical stability is unsuitable for sterilisation by irradiation with the electron beam emission but it cannot be excluded that it will be shown suitable for sterilisation by gamma irradiation.

As to the methods used, the most suitable for the studies of radiochemical stability of azole derivatives proved to be the direct instrumental methods (EPR, DSC) and chromatographic-spectroscopic methods, in particular HPLC-MS and ^{13}C -NMR. The methods that provided the least information on the changes taking place in the compounds studied as a result of exposure to ionic radiation were FT-IR, SEM and ^1H -NMR.

8. *Spis rycini tabel*

Ryc. 1. Metody sterylizacji substancji i produktów leczniczych [13-15]	3
Ryc. 2. Porównanie rozkładu substancji stałych i roztworów wodnych [26]	4
Ryc. 3. Kluczowe wydarzenia w rozwoju leków przeciwgrzybiczych [40]	7
Ryc. 4. Struktury I generacji imidazoli przeciwgrzybiczych	9
Ryc. 5. Podział pochodnych azolowych ze względu na drogę podania [8,15]	10
Ryc. 6. Podział leków przeciwgrzybiczych pochodnych azolu [40,44,45]	11
Ryc. 7. Synteza klotrymazolu [58]	14
Ryc. 8. Synteza mikonazolu [58]	15
Ryc. 9. Synteza ketokonazolu [58,59]	15
Ryc. 10. Synteza flukonazolu [60]	16
Ryc. 11. Mechanizm działania niektórych leków przeciwgrzybiczych [61]	17
Ryc. 12. Powstawanie DAK - głównego metabolitu ketokonazolu [63]	19
Ryc. 13. Rozkład DAK pod wpływem monoooksygenazy flawinowej [63,64]	20
Ryc. 14. Metabolizm mikonazolu [65]	21
Ryc. 15. Metabolity klotrymazolu [66]	22
Ryc. 16. Chromatogram HPLC wzorców oznaczanych azoli i konserwantów [86]	24
Ryc. 17. Rozpuszczalność mikonazolu w zależności od pH i składu buforu [89]	25
Ryc. 18. Struktury izomerów ketokonazolu [107]	27
Ryc. 19. Pierwsza pochodna widma UV azotanu mikonazolu (a) oraz druga pochodna widma UV ketokonazolu (b), rozpuszczalnik metanol [108]	27
Ryc. 20. Widma absorpcji kompleksów DDQ z pochodnymi azolu (rozpuszczalnik metanol) [116]	28
Ryc. 21. Krzywe DSC flukonazolu: A-związek wyjściowy, B-rekrytalizacja z metanolu, C-rekrytalizacja z acetonu, D-rekrytalizacja z chloroformu [127]	29
Ryc. 22. Trwałość ketokonazolu w roztworach wodnych: wpływ pH [95]	31
Ryc. 23. Fotodegradacja ketokonazolu (roztwór metanolowy 10mg/100ml) [133,137]	31
Ryc. 24. Hydroliza kwasowa klotrymazolu [72, 79-81]	32
Ryc. 25. Widma UV badanych pochodnych azolu	41
Ryc. 26. Mikrofotografie SEM dla KK i CK przed (A) i po napromieniowaniu (B) dawką 200 kGy	49
Ryc. 27. Dyfraktogramy proszkowe dla CK i MK przed i po napromieniowaniu	50
Ryc. 28. Dyfraktogramy proszkowe dla FK przed i po napromieniowaniu	51
Ryc. 29. Krzywe DSC dla KK i CK przed i po napromieniowaniu	52
Ryc. 30. Krzywe DSC dla FK i MK przed i po napromieniowaniu	53
Ryc. 31. Zależności T_{max} , T_{onset} (A) i ΔH (B) od dawki promieniowania dla FK	54
Ryc. 32. Zależności T_{max} , T_{onset} (A) i ΔH (B) od dawki promieniowania dla MK	55
Ryc. 33. Widma FT-IR dla CK przed i po napromieniowaniu	57
Ryc. 34. Widma mas dla FK przed i po napromieniowaniu	58
Ryc. 35. Proponowane drogi fragmentacji FK	60
Ryc. 36. Widma mas dla KK przed i po napromieniowaniu	61
Ryc. 37. Proponowane drogi fragmentacji KK	63
Ryc. 38. Widma mas dla CK przed i po napromieniowaniu	64

Ryc. 39. Proponowane drogi fragmentacji CK	66
Ryc. 40. Widma mas dla MK przed i po napromieniowaniu	67
Ryc. 41. Proponowane drogi fragmentacji MK	69
Ryc. 42. Widma EPR badanych związków po napromieniowaniu dawką 25 kGy	71
Ryc. 43. Czas życia wolnych rodników powstałych po napromieniowaniu badanych azoli dawką 25 kGy	72
Ryc. 44. Stężenie wolnych rodników w próbkach azoli napromieniowanych dawką 25 kGy oraz po 352 dniach przechowywania	73
Ryc. 45. Wydajność radiolityczna tworzenia się wolnych rodników podczas napromieniowania badanych związków dawką 25 kGy	73
Ryc. 46. Widma UV 0,02% roztworów FK (H ₂ O) oraz KK i MK (CH ₃ OH) przed i po napromieniowaniu	75
Ryc. 47. Widma UV dla CK przed i po napromieniowaniu (0,03%, CH ₃ OH)	76
Ryc. 48. Pierwsza pochodna widm UV dla KK przed i po napromieniowaniu	76
Ryc. 49. Pierwsza i druga pochodna widm UV dla CK przed i po napromieniowaniu	78
Ryc. 50. Widma 1H-NMR dla FK przed (A) i po napromieniowaniu (B) dawką 400 kGy	80
Ryc. 51. Widma 1H-NMR dla KK przed (A) i po napromieniowaniu (B) dawką 400 kGy	82
Ryc. 52. Widma 1H-NMR dla CK przed (A) i po napromieniowaniu (B) dawką 400 kGy	84
Ryc. 53. Widma 13C-NMR dla MK przed (A) i po napromieniowaniu dawką 400 kGy (B)	86
Ryc. 54. Schematy wybranych chromatogramów TLC pochodnych azolu przed i po napromieniowaniu	88
Ryc. 55. Chromatogramy HPLC dla MK, KK i CK przed i po napromieniowaniu	89
Ryc. 56. Widma absorpcji pochodnych azolu oraz ich produktów radiolizy (po napromieniowaniu dawką 800 kGy)	91
Ryc. 57. Zawartość FK, CK, KK i MK (oznaczona metoda HPLC) vs dawka promieniowania	92
Ryc. 58. Zależność G od dawki w procesie radiolizy pochodnych azolu	93
Ryc. 59. Chromatogramy HPLC pochodnych azolu napromieniowanych dawką 800 kGy	95
Ryc. 60. Widma CID produktów radiolizy FK	96
Ryc. 61. Wybrane fragmentacje masowe produktów radiolizy FK	97
Ryc. 62. Widma CID produktów radiolizy CK	98
Ryc. 63. Wybrane fragmentacje masowe produktów radiolizy CK	98
Ryc. 64. Widma CID produktów radiolizy KK	99
Ryc. 65. Wybrane fragmentacje masowe produktów radiolizy KK	100
Ryc. 66. Widma CID produktów radiolizy MK	101
Ryc. 67. Wybrane fragmentacje masowe produktów radiolizy MK	102
Ryc. 68. Stężenie wolnych rodników w substancjach leczniczych napromieniowanych dawką 25 kGy [32,38,143-145]	110
Ryc. 69. Wydajność radiolityczna badanych pochodnych azolu	114
Ryc. 70. Schemat procesów odpowiedzialnych za tworzenie się produktów radiolizy FK	116
Ryc. 71. Schemat procesów odpowiedzialnych za tworzenie się produktów radiolizy CK	117
Ryc. 72. Porównanie widm UV dla CK i jego głównego produktu radiodegradacji a. widma UV przed rozdziałem b. widma UV po rozdziale HPLC	118
Ryc. 73. Schemat procesów odpowiedzialnych za tworzenie się produktów radiolizy KK	119
Ryc. 74. Schemat procesów odpowiedzialnych za tworzenie się produktów radiolizy MK	120

Tabela 1. Leki przeciwgrzybicze - kolejność wprowadzania do lecznictwa [7,45,46]	8
Tabela 2. Budowa pochodnych azolu II-IV generacji	12
Tabela 3. Przykłady potencjalnych interakcji ketokonazolu i itraconazolu [61]	18
Tabela 4. Charakterystyka 4 pochodnych azolu o działaniu przeciwgrzybiczym uszeregowanych wg wzrastającej masy molowej	32
Tabela 5. Ocena statystyczna krzywych wzorcowych	41
Tabela 6. Zestawienie parametrów charakteryzujących metodę oznaczania badanych pochodnych azolu za pomocą spektrofotometrii w UV	42
Tabela 7. Warunki rozdziału badanych pochodnych azolu metodą HPLC	43
Tabela 8. Zestawienie różnicy mas badanych pochodnych azolu przed i po napromieniowaniu	45
Tabela 9. Wyniki analizy organoleptycznej badanych pochodnych azolu wg szybkości zmiany zabarwienia	47
Tabela 10. Parametry piku topnienia badanych związków przed i po napromieniowaniu wyznaczone metodą DSC (uszeregowane wg wzrastającego przesunięcia temp. topn.)	51
Tabela 11. Wyniki analizy DSC dla FK	53
Tabela 12. Wyniki analizy DSC dla MK	54
Tabela 13. Najintensywniejsze jony widma mas dla FK	58
Tabela 14. Najintensywniejsze jony widma mas KK	61
Tabela 15. Najintensywniejsze jony widma mas CK	64
Tabela 16. Najintensywniejsze jony widma mas MK	67
Tabela 17. Parametry widm mas badanych pochodnych azolu	70
Tabela 18. Pomiar pH roztworów FK przed i po napromieniowaniu	74
Tabela 19. Zmiany w przebiegu widm absorpcji oraz I i II pochodnej widm UV dla CK po napromieniowaniu	77
Tabela 20. Zmiany absorbancji widm UV pochodnych azolu po napromieniowaniu	78
Tabela 21. Wyniki analizy ¹³ C-NMR dla FK przed i po napromieniowaniu	79
Tabela 22. Wyniki analizy ¹ H-NMR dla FK przed i po napromieniowaniu	80
Tabela 23. Wyniki analizy ¹³ C-NMR dla KK przed i po napromieniowaniu	81
Tabela 24. Wyniki analizy ¹ H-NMR dla KK przed i po napromieniowaniu	82
Tabela 25. Wyniki analizy ¹³ C-NMR dla CK przed i po napromieniowaniu	83
Tabela 26. Wyniki analizy ¹ H-NMR dla CK przed i po napromieniowaniu	84
Tabela 27. Wyniki analizy ¹³ C-NMR dla MK przed i po napromieniowaniu	85
Tabela 28. Wyniki analizy ¹ H-NMR dla MK przed i po napromieniowaniu	86
Tabela 29. Zestawienie wyników analizy TLC pochodnych azolu	87
Tabela 30. Wyniki analizy HPLC pochodnych azolu przed i po napromieniowaniu	90
Tabela 31. Wydajność radiolityczna procesu radiodegradacji	94
Tabela 32. Zestawienie proponowanych struktur produktów radiodegradacji FK	104
Tabela 33. Zestawienie proponowanych struktur produktów radiodegradacji CK i KK	105
Tabela 34. Zestawienie proponowanych struktur produktów radiodegradacji MK	106
Tabela 35. Porównanie efektywności technik bezpośrednich w badaniach trwałości radiochemicznej pochodnych azolu	108
Tabela 36. Przydatność metod pośrednich w badaniach trwałości radiochemicznej pochodnych azolu	111
Tabela 37. Porównanie liczby produktów radiolizy pochodnych azolu	112
Tabela 38. Zestawienie najważniejszych zmian pochodnych azolu po napromieniowaniu standardową dawką sterylizacyjną oraz najwyższą	113
Tabela 39. Zestawienie parametrów kinetycznych badanych pochodnych azolu	115
Tabela 40. Porównanie reakcji radiodegradacji badanych pochodnych azolu	121
Tabela 41. Szeregi trwałości radiochemicznej pochodnych	121

9. Piśmiennictwo:

1. Bogacka E., Matkowski K.:
Wpływ grzybów na zdrowie ludzi
Mikol. Lek. 8, 175-178, **2001**.
2. Baran. E. (red.):
Zarys mikologii lekarskiej.
Volumed, Wrocław, **1998**.
3. Deacon J.W.:
Modern mycology
Blackwell Sciences Ltd. Oxford **1997**.
4. Ainsworth G.C.:
Introduction to the history of mycology
Cambridge University Press, Cambridge., London, New York, Melbourne, **1976**.
5. Wierzbicka M.:
Grzybice układowe – współczesne zagrożenia
Nowa Medycyna, 4, 23-25, **2000**.
6. Pfaller M., Wenzel R.:
Impact of the changing epidemiology of fungal infections in the 1990s
Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 11, 287-291, **1992**.
7. Maleszka P., Baran E.:
Lecznictwo mikologiczne w końcu dwudziestego wieku
Mikol. Lek. 7, 47-55, **2000**.
8. Rabkin J.M., Oroloff S.L., Corless C.L., Benner K.G., Flora K.D., Rosen H.R., Olyaei A.J.:
Association of fungal infection and increased mortality in liver transplant recipients
Am. J. Surg. 179, 426-430, **2000**.
9. Mizuta M., Blumberg E.A.:
Impact of fungal infections on solid-organ transplant recipients
Clin. Microbiol. Newslett. 27, 123-126, **2005**.
10. Murray C.K., Loo F.L., Hospenthal D.R., Cancio L.C., Jones J.A., Kim S. H., Holcomb J. B., Wade C. E., Wolf S. E.:
Incidence of systemic fungal infection and related mortality following severe burns
Burns, 34, 1108-1112, **2008**.
11. McNeil M.M., Nash S.L., Hajjeh R.A., Phelan M.A., Conn L.A., Plikaytis B.D., Warnock D.W.:
Trends in mortality due to invasive mycotic diseases in the united states, 1980-1997
Clin. Infect. Dis. 33, Supplement S2, S67-S106, **2001**.
12. Zając M., Pawełczyk E., Jelińska A.:
Chemia leków
Akademia Medyczna im. K. Marcinkowskiego, Poznań **2006**.

13. *Farmakopea Polska VIII*,
PTFarm, Warszawa, **2008**.
14. *European Pharmacopoeia - 6th edition*
Council of Europe, Strasburg, **2008**.
15. Halls N. A.:
Achieving sterility in medical and pharmaceutical products
Marcel Dekker Inc., New York, **1994**.
16. *EN552, Sterilization of medical devices - validation and routine control of sterilization by irradiation*
European Committee for Standardization, Belgium, **1994**.
17. Marciniak B., Dettlaff K.:
Radiation sterilization of drugs
Ed.: *Trends in radiation sterilization of health care products*, IAEA, Vienna, 187 – 230, **2008**.
18. Kaźmierczak M., Dorna M., Kaźmierczak J.:
Technologia recepturowych kropli do oczu z flukonazolem o działaniu przeciwgrzybiczym
Kompleksowa ocena jakości substancji leczniczych i postaci leków
Materiały Konferencji Naukowej. Poznań, 18-19 IX 2003 (Red.: Zenon J. Kokot, Jan Pawlaczyk).
Poznań, 128, **2003**.
19. Kaźmierczak M., Kwiczak-Witkowska A., Zareńska A., Kaźmierczak J.:
Ocena kropli do oczu z flukonazolem o działaniu przeciwgrzybiczym
Kompleksowa ocena jakości substancji leczniczych i postaci leków
Materiały Konferencji Naukowej. Poznań, 18-19 IX 2003 (Red.: Zenon J. Kokot, Jan Pawlaczyk).
Poznań, 128, **2003**.
20. Piel. G., Hayette M.P., Pavoni E., Evrard B., Van Hees T., de Hassonville S.H., De Mol P., Delatte L.:
In vitro comparison of the antimicrobial activity of a miconazole-HP- β -cyclodextrin solution with a miconazole surfactant solution
J. Antimicrob. Chemother. 48, 83-87, **2001**.
21. Sevilla M. D., Bernhard W. A.:
Mechanisms of direct radiation damage to DNA in: Radiation chemistry from basics to application in material and life science
EDP Sciences, France, **2008**.
22. Rażem D.:
Radiation sterilization of pharmaceuticals: an overview of the literature
Ed.: *Trends in radiation sterilization of health care products* str. 175-186.
IAEA, Wiedeń, Austria, **2008**.
23. Tilquin B.:
Radiosterilization of drugs
Ed.: Spothem-Maurizot M., Mostafavi M. Douki T., Belloni J. (red.):
Radiation chemistry from basics to application in material and life sciences
EDP Sciences, Les Ulis, Francja **2008**.

-
24. Gopal N. G. S., Patel K. M., Sharma G., Bhalla H. L., Wills P. A., Hilmy N.:
Guide for radiation sterilization of pharmaceuticals and decontamination of raw materials
Radiat. Phys. Chem., 32, 619 – 622, **1988**.
 25. Boess C., Bögl K. W.:
Influence of radiation treatment on pharmaceuticals-a review: alkaloids, morphine derivatives, and antibiotics
Drug Dev. Ind. Pharm., 22, 495-529, **1996**.
 26. Boess C., Bögl K. W.:
Influence of radiation treatment on pharmaceuticals
12th Int. Meeting on Radiation Processing, Avignon, March, 25-30, **2001**.
 27. Zagórski P. Z.:
Sterylizacja radiacyjna
ICH TJ, Warszawa **2007**.
 28. Marciniec B., Przybytniak G., Ogrodowczyk M.:
EPR study of some E-beam irradiated steroids in the solid state
Ann. Pol.Chem. Soc. II, 238-241, **2005**.
 29. Miyazaki T., Kaneko T., Yoshimura T., Crucq A. S., Tilquin B.
Electron spin resonance study of radiosterilization of antibiotics: ceftazidime
J. Pharm. Sci., 83, 68 -71, **1994**.
 30. Basly J. P., Duroux J. L., Bernard M. :
Gamma irradiation sterilization of orciprenaline and fenoterol
Int. J. Pharm. 142, 125 – 128, **1996**.
 31. Varshney L., Dodke P. B.:
Radiation effect studies on anticancer drugs, cyclophosphamide and doxorubicin for radiation sterilization
Radiat. Phys. Chem., 71, 1103- 1111 , **2004**.
 32. Marciniec B., Kozak M., Naskrent M., Dettlaff K., Ogrodowczyk M., Stawny M., Wachowski L. :
Thermal study of four irradiated imidazoline derivatives in solid state
J. Therm. Anal. Calorim. 88, 337 – 342, **2007**.
 33. Dettlaff K., Teżyk A., Marciniec B., Wachowiak R., Naskrent M., Bednarek B.:
Radiation sterilization of ephedrine in the solid state
Chem. Anal., 53, 171 – 186, **2008**.
 34. Pronce T., Tilquin B. :
Radiosterilisation et radioracemisation
J. Chim. Phys., 94, 390-394, **1997**.
 35. Marciniec B., Kozak M., Wachowski L., Ogrodowczyk M.:
Evaluation of radiostability of some steroid derivatives
J. Therm. Anal. Calorim. 73, 473-485, **2003**.
 36. Katušin-Ražem B., Hamitouche K., Maltar-Strmečki N., Kos K., Pucić I., Britvić-Budicin S., Ražem D.:
Radiation sterilization of ketoprofen
Radiat. Phys. Chem., 73, 111-116, **2005**.
-

-
37. Marciniak B., Kozak M., Ogrodowczyk M.:
Thermal analysis in evaluation of the radiostability of some 1,4-dihydropyridine derivatives
J. Therm. Anal. Calorim. 77, 581-596, **2004**.
38. Marciniak B., Stawny M., Kozak M., Naskrent M.:
The effect of ionizing radiation on chloramphenicol
J. Therm. Anal. Cal. 84, 741-746, **2006**.
39. Kane M. P., Tsuji K.
Radiolytic degradation schemes for Co-60 irradiated corticosteroids
J. Pharm. Sci. Technol., 37, 51-54, **1982**.
40. Maertens J. A.:
History of development of azole derivatives
Clin. Microbiol. Infect. 10, (Suppl. 1), 1-10, **2004**.
41. Sheehan D.J., Hitchcock C.A., Sibley C. M.:
Current and emerging azole antifungal agents
Clin. Microbiol. Rev. 12, 40-79, **1999**.
42. Zejc A., Gorczyca M. (red.):
Chemia leków
Wydawnictwo lekarskie PZWL, Warszawa **1998**.
43. Gentles J. C. :
Experimental ringworm in guinea pigs: oral treatment with griseofulvin
Nature 182, 476 – 477, **1958**. doi:10.1038/182476a0.
44. Gwieździński Z.:
Zakażenia grzybicze skóry i błon śluzowych – nowoczesne leczenie
Przew. Lek. 8, 90-95, **2000**.
45. Szymańska M., Baranowski A., Płachta D.:
Przegląd preparatów najczęściej stosowanych w leczeniu chorób grzybiczych.
Biul. Wydz. Farm. AMW. 1, **2007** <http://biuletynfarmacji.wum.edu.pl>
46. Holt R.J.:
Recent developments in antimycotic chemotherapy.
Infection 2, 95-107, **1974**.
47. Ziółkowska G., Tokarzewski S.:
Aktualne problemy w leczeniu i profilaktyce infekcji grzybiczych u ptaków
Ann. UMCS Sect. DD 62, 70-79, **2007**.
48. Wade T.R., Jones H.E., Chanda J.J.:
Intravenous miconazole therapy of mycotic infections
Arch. Intern. Med. 139, 784-786, **1979**.
49. Pasqualotto A., C., Denning D.W.:
New and emerging treatments for fungal infections
J. Antimicrob. Chemoth. 61, Suppl. i19-i30, **2008**.
-

-
50. Schiller D.S., Fung H.B.:
Posaconazole: An extended-spectrum triazole antifungal agent
Clin. Ther. 29, 1862-1886, **2007**.
51. Odds F.C.:
Antifungal agents: their diversity and increasing sophistication
Mycologist 17, 51-55, **2003**.
52. Rezaei Z., Khabnadideh S., Pakshir K., Hossaini Z., Amiri F., Assadpour E.:
Design, synthesis, and antifungal activity of triazole and benzotriazole derivatives
Eur. J. Med. Chem. 44, 3064-3067, **2009**.
53. De Sarro A., La Cembra E., Fera M.T.:
New and investigational triazole agents for the treatment of invasive fungal infections
J. Chemother. 20, 661-671, **2008**.
54. Katz H.I.:
Systemic antifungal agents used to treat onychomycosis
J. Am. Acad. Derm. 38, S48-S52, **1998**.
55. Che X., Sheng C., Wang W., Cao Y., Xu Y., Ji H., Dong G., Miao Z., Yao J., Zhang W.:
New azoles with potent antifungal activity: Design, synthesis and molecular docking
Eur. J. Med. Chem. 44, 4218-4226, **2009**.
56. Rostom S.A.F.; Ashour H.M.A.; Razik H.A. Abd El; Fattah Abd El, Fattah H. Abd El, Nagwa N. El-Din:
Azole antimicrobial pharmacophore-based tetrazoles: Synthesis and biological evaluation as potential antimicrobial and anticonvulsant agents
Bioorg. Med. Chem 17, 2410-2422, **2009**.
57. Nowaczyk A., Modzelewska-Banachiewicz B.:
Triazole derivatives with antifungal activity: a pharmacophore model study
Acta Polon. Pharm. 65, 795-798, **2008**.
58. Vardanyan R., Hruby V.J.:
Essential of drugs
Elsevier B.V. **2006**.
59. Heeres J., Backx L.J.J., Mostmans J.H., Van Cutsem J.;
Antimicrobial Imidazoles. Part. 4. Synthesis and antifungal activity of ketoconazole, a new potent orally active board-spectrum antifungal agent
J. Med. Chem. 22, 1003-1005, **1979**.
60. Johnson D.S., Li J.J.:
The art of drug synthesis
John Wiley and Sons Inc. New Jersey, USA **2007**.
61. Katzung B.G., Masters S.B., Trevor A.J.:
Basic and Clinical Pharmacology
11th Edition, McGraw-Hill, **2009**.
62. Katz H.I.,
Systemic antifungal agents used to treat onychomycosis
J. Am. Acad. Derm. 38, S48-S52, 1998.
-

-
63. Sweetman S.C.:
Martindale: The Complete Drug Reference
36th Edition, Pharmaceutical Press, **2009**.
64. Rodrigez R.J., Acosta D.:
Metabolism of ketoconazole and deacetylated ketoconazole by rat hepatic microsomes and flavin-containing monooxygenases
Drug Metab. Dispos. 25, 772-777, **1997**.
65. Huang Y.C., Colaizzi J.L., Bierman R.H, Woestenborghs R., Heykants J.:
Pharmacokinetics and dose proportionality of ketoconazole in normal volunteers
Antimicrob. Agents Chemother. 30,206-210, **1986**.
66. Hoogerheide J.G., Wyka B.E.:
Clotrimazole. Ed.: Florey K.: *Analytical profiles of drug substances*. Tom 11,
Academic Press 226-255, **1982**.
67. Pandey R., Ahmad Z., Sharma S., Khuller G.K.:
Nano-encapsulation of azole antifungals: Potential applications to improve oral drug delivery
Int. J. Pharm. 301, 268–276, **2005**.
68. Zhang J., Wang L., Gao C., Zhang L., Xia H.:
Ocular pharmacokinetics of topically-applied ketoconazole solution containing hydroxypropyl beta-cyclodextrin to rabbits
J. Ocul. Pharmacol. Ther. 24, 501-506, **2008**.
69. Whitehouse L.W., Menzies A., Dawson B., Zamecnik J., Sy W.W.:
Deacetylated ketoconazole: A major ketoconazole metabolite isolated from mouse liver
J. Pharm. Biomed. anal 8, 603-606, **1990**.
70. Wenzl T. G., Schefels J., Hörnchen H., Skopnik H.:
Pharmacokinetics of oral fluconazole in premature infants
Eur. J. Pediatr. 157, 661-662, **1998**.
71. Cociglio M., Brandissou S., Alric R. Bressolle F.:
High-performance liquid chromatographic determination of fluconazole in plasma
J. Chromatogr. B, 686, 11-17 11-17, **1996**.
72. Launay-Vacher V., Deray G.:
Maniement du fluconazole chez le patient insuffisant renal [Fluconazole in patients with renal insufficiency]
Réanimation 12, 253-024, **2003**.
73. Egle H., Trittler R., Kümmerer K.:
A new, rapid, fully automated method for determination of fluconazole in serum by column-switching liquid chromatography
Ther. Drug Monit. 26, 425-431, **2004**.
74. Koks C.H.W., Rosing H., Meenhorst P.L., Bult A., Beijnen J.H.:
High-performance liquid chromatographic determination of the antifungal drug fluconazole in plasma and saliva of human immunodeficiency virus-infected patients
J. Chromatogr. B, 663, 345-351, **1995**.
75. Wallace J.E., Harris S.C., Gallegos J., Foulds G., Chen T.J.H., Rinaldi M.G.:
Assay of fluconazole by high-performance liquid chromatography with a mixed-phase column
Antimicrob. Agents Chemother. 36, 603-606, **1992**.
-

-
76. Bafeltowska J.J., Buszman E.:
Pharmacokinetics of fluconazole in the cerebrospinal fluid of children with hydrocephalus
Chemotherapy. 51, 370-376, **2005**.
77. Puranajoti P., Kasina R., Tenjarla S.:
Microbiological and HPLC analysis of miconazole in skin, serum and phase-solubility studies
J. Clin. Pharm. Ther. 24, 445-450, **1999**.
78. Selinger K., Matheou D., Hill H.M.:
High-performance liquid chromatographic method for the determination of miconazole in vaginal fluid
J. Chromatogr. 434, 259-264 **1988**.
79. Gordien J.B., Pigneux A., Vigouroux S., Tabrizi R., Accoceberry I., Bernadou J.M., Rouault A., Saux M.C. Breilh D.:
Simultaneous determination of five systemic azoles in plasma by high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection
J Pharm. Biomed. Anal. 2009 Article in Press, Corrected Proof
doi:10.1016/j.jpba.2009.06.030.
80. Ng T.K., Chan R.C., Adeyemi-Doro F.A., Cheung S.W., Cheng A.F.:
Rapid high performance liquid chromatographic assay for antifungal agents in human sera
J. Antimicrob. Chemother. 37, 465-72, 1996.
81. Baranowska I, Markowski P, Baranowski J.:
Development and validation of an HPLC method for the simultaneous analysis of 23 selected drugs belonging to different therapeutic groups in human urine samples
Anal Sci. 25, 1307-1313, **2009**.
82. Saari T.I., Laine K., Bertilsson L., Neuvonen P.J., Olkkola K.T.:
Voriconazole and fluconazole increase the exposure to oral diazepam
Eur. J. Clin.Pharmacol. 63, 941-949, **2007**.
83. Saari T.I., Laine K., Neuvonen M., Neuvonen P.J., Olkkola K.T.:
Effect of voriconazole and fluconazole on the pharmacokinetics of intravenous fentanyl
Eur. J. Clin. Pharmacol. 64, 25-30, **2008**.
84. Abdel-Moety E.M., Khattab F.I., Kelani K.M., AbouAl-Alamein A.M.:
Chromatographic determination of clotrimazole, ketoconazole and fluconazole in pharmaceutical formulations
Farmaco 57, 931-938, **2002**.
85. Low A.S., Wangboonskul J.:
An HPLC assay for the determination of ketoconazole in common pharmaceutical preparations
Analyst, 124, 1589-1593, **1999**.
86. Gagliardi L., De Orsi D., Chimenti P., Porra R., Tonelli D.:
HPLC determination of imidazole antimycotics in antidandruff cosmetic products.
Anal. Sci. 19, 1195-1198, **2003**.
87. Stanisław B., Zając M.:
Metoda HPLC do identyfikacji i oznaczania pochodnych imidazolu w preparatach farmaceutycznych
Biul. Inst. Lek. 46, 19-30, **2002**.
-

-
88. Pedersen M., Bjerregaard S., Jacobsen J., Sørensen A.M.:
A genuine clotrimazole γ -cyclodextrin inclusion complex-isolation, antimycotic activity, toxicity and an unusual complex-isolation, antimycotic activity, toxicity and an unusual dissolution rate
Int. J. Pharm. 176, 121-131, **1998**.
89. Kovács K., Stampf G., Klebovich I., Antal i., Ludányi K.:
Aqueous solvent system for the solubilization of azole compounds
Eur. J. Pharm. Sci. 36, 352-358, **2009**.
90. Hoogerheide J.G., Strusiak S.H., Taddei C.R., Townley E.R., Wyka B.E.:
High performance liquid chromatographic determination of clotrimazole in pharmaceutical formulations
J. Assoc. Off. Anal. Chem. 64, 864-869, **1981**.
91. Hájková R., Sklenářová H., Matysová L., Švecová P., Solich P.:
Development and validation of HPLC method for determination of clotrimazole and its two degradation products in spray formulation
Talanta 73, 483-489, **2007**.
92. Xu Q.A., Trissel L.A.:
Stability-indicating HPLC methods for drug analysis.
3rd Edition, Pharmaceutical Press, 181-182, **2008**.
93. Yamreudeewong W., Lopez-Anaya A., Rappaport H.:
Stability of fluconazole in an extemporaneously prepared oral liquid
Am. J. Hosp. Pharm. 50, 2366-2367, **1993**.
94. Hunt-Fugate A.K., Hennessey C.K., Kazarian C.M.:
Stability of fluconazole in injectable solutions
Am. J. Hosp. Pharm. 50, 1186-1187, **1993**.
95. Skiba M., Skiba-Lahiani M., Marchais H., Duclos R., Arnaud P.:
Stability assessment of ketoconazole in aqueous formulations.
Int. J. Pharm. 198, 1-6, **2000**.
96. Szathmary S.C., Luhmann I.:
Sensitive and automated gas chromatographic method for the determination of miconazol in plasma samples
J. Chromatogr. B, 425, 193-196, **1988**.
97. Wood P.R., Tarbit M.H.:
Gas chromatographic method for the determination of fluconazole, a novel antifungal agent, in human plasma and urine
J. Chromatogr. B, 383, 179-186, **1986**.
98. Brammer K.W., Coates R.E.:
Pharmacokinetics of fluconazole in pediatric patients
Eur J. Clin. Microbiol. Infect. Dis., 13, 325-329, **1994**.
99. Peschka M., Roberts P.H., Knepper T.P.:
Analysis, fate studies and monitoring of the antifungal agent clotrimazole in the aquatic environment
Anal Bioanal Chem 389, 959-968, **2007**.
-

100. Roychowdhury U., Das S.K.:
Rapid identification and quantitation of clotrimazole, miconazole and ketoconazole in pharmaceutical creams and ointments by thin-layer chromatography–densitometry
J. Assoc. Off. Anal. Chem. 79, 656-659, **1996**.
101. Ekiert R.J., Krzek J., Rzeszutko W.:
Evaluation of a TLC densitometric method for analysis of azole antifungal agents
Chromatographia 67, 995-998, **2008**.
102. Meshram D.B., Bagade S.B., and Tajne M.R.:
TLC-densitometric analysis of clotrimazole and metronidazole in combined dosage forms.
J. Planar Chromatogr. 21, 277-282, **2008**.
103. Vaidya V.V., Menon S.N., Singh G.R., Kekare M.B., Choukekar M.P.:
Simultaneous HPTLC determination of clotrimazole and tinidazole in a pharmaceutical formulation
J. Planar Chromatogr. 20, 145-147, **2007**.
104. Wienen F., Laug S., Baumann K., Schwab A., Just S., Holzgrabe U.:
Determination of clotrimazole in mice plasma by capillary electrophoresis
J. Pharm. Biomed. Anal. 30, 1879-1887, **2003**.
105. Crego A.L., Marina M.L., Lavandera J.L.:
Optimization of the separation of a group of antifungals by capillary zone electrophoresis
J. Chromatogr. A 917, 337-345, **2001**.
106. Crego A.L., Gómez J., Marina M.L., Lavandera J.L.:
Application of capillary zone electrophoresis with off-line solid-phase extraction to in vitro metabolism studies of antifungals
Electrophoresis 22, 2503-2511, **2001**.
107. Velikinac I., Cudina O., Janković I., Agbaba D., Vladimirov S.:
Comparison of capillary zone electrophoresis and high performance liquid chromatography methods for quantitative determination of ketoconazole in drug formulations
Farmaco 59, 419-424, 2004.
108. Ekiert R.J., Krzek J.:
Determination of azole antifungal medicines using zero-order and derivative uv spectrophotometry
Acta Polon. Pharm. 66, 19-24, **2009**.
109. Göger N.G., Aboul-Enein H.Y.:
Quantitative determination of fluconazole in capsules and IV solutions by UV spectrophotometric methods.
Anal. Lett. 34, 2089-2098, **2001**.
110. Aboul-Enein H.Y., Göger N.G., Türkalp A.:
Quantitative determination of fluconazole in syrups by first order derivative spectrophotometry
Anal. Lett. 35, 1193-1204, **2002**.
111. Kedor-Hackmann E.M.R.; Miritello Santoro M.I.R.; Singh A.K.; Cricco Peraro A.:
First-derivative ultraviolet spectrophotometric and high performance liquid chromatographic determination of ketoconazole in pharmaceutical emulsions
Rev. Bras. Cienc. Farm. 42, 91-98, **2006**.

-
112. Wróbel K., Wróbel K., De La Garza Rodriguez I.M., Lopez-De-Alba P.L., Lopez-Martinez L.:
Determination of miconazole in pharmaceutical creams using internal standard and second derivative spectrophotometry
J. Pharm. Biomed. Anal. 20, 99-105, **1999**.
113. Erk N., Altunb M.L.:
Spectrophotometric resolution of metronidazole and miconazole nitrate in ovules using ratio spectra derivative spectrophotometry and RP-LC
J. Pharm. Biomed. Anal. 25, 115-122, **2001**.
114. Khashaba P.Y., El-Shabouri S.R., Emara K.M., Mohamed A.M.:
Analysis of some antifungal drugs by spectrophotometric and spectrofluorimetric methods in different pharmaceutical dosage forms
J. Pharm. Biomed. Anal. 22, 363 – 376, **2000**.
115. Abdelmageed O.H., Khashaba P.Y.:
Spectrophotometric determination of clotrimazole in bulk drug and dosage forms.
Talanta, **40**, 1289-1294, **1993**.
116. Farhadi K, Maleki R.:
Triiodide ion and alizarin red S as two new reagents for the determination of clotrimazole and ketoconazole
J Pharm Biomed Anal. 30, 1023-1033, 2002.
117. Guo Q.L., Li R., Zhou X., Liu Y.:
Study on the interaction of ketoconazole with human and bovine serum albumins by fluorescence spectroscopy
Chin. J. Chem., 26, 2207 – 2215, **2008**.
118. Cyr T.D., Dawson B.A., Neville G.A., Shurvell H.F.:
Spectral characterization of fluconazole
J. Pharm. Biomed. Anal. 14, 247-255, **1996**.
119. Inkmann E., Holzgrabe U.:
¹H and ¹³C nuclear magnetic resonance studies of the sites of protonation in itraconazole and fluconazole
J. Pharm. Biomed. Anal. 20,297-307, **1999**.
120. Arranz P., Arranz A., Moreda J.M., Cid A. Arranz J.F.:
Stripping voltammetric and polarographic techniques for the determination of anti-fungal ketoconazole on the mercury electrode
J. Pharm. Biomed. Anal. 33, 589-596, **2003**.
121. Pereira F. C., Zanoni M.V.B. , Guaratini C.C.I., Fogg A.G.:
Differential pulse polarographic determination of clotrimazole after derivatization with Procion Red HE-3B
J. Pharm. Biomed. Anal. 27, 201-208, **2002**.
122. Desai S.R., Shaikh M.M., Dharwadkar S.R.:
Preformulation compatibility studies of etamsylate and fluconazole drugs with lactose by DSC
J. Therm. Anal. Calorim. 71, 651-658, **2003**.
123. Jun-hua Wang, Zaisheng Cai:
Investigation of inclusion complex of miconazole nitrate with β -cyclodextrin
Carbohydrate Polymers, Volume 72, 255-260, **2008**.
-

-
124. Taneri F., Güneri T., Aigner Z., Kata M.:
Improvement in the physicochemical properties of ketoconazole through complexation with cyclodextrin derivatives
J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem.22, 257-260, **2002**.
125. Taneri F., Güneri T., Aigner Z., Kata M.:
Thermoanalytical studies on complexes of ketoconazole with cyclodextrin derivatives
J. Therm. Anal. Calorim.77, 769-777, **2003**,
126. Moura E.A., Correia L.P., Pinto M.F., Procópio J.V.V., de Souza F.S., Macedo R.O.: *Thermal characterization of the solid state and raw material fluconazole by thermal analysis and pyrolysis coupled to GC/MS*
J. Therm. Anal. Calorim. DOI 10.1007/s10973-009-0473-x
127. Park H.J., Kim M.S., Lee S., Kim J.S., Woo J.S., Park J.S., Hwang S.J.:
Recrystallization of fluconazole using the supercritical antisolvent (SAS) process
Int. J. Pharm. 328, 152–160, **2007**.
128. Karasulu H.Y., Hilmiolu S., Metin D.Y., Güneri T.:
Efficacy of a new ketoconazole bioadhesive vaginal tablet on Candida albicans
Farmaco 59, 163-167, **2004**.
129. Hahn Y.H., Ahearn D.G., Wilson L.A.:
Comparative efficacy of amphotericin B, clotrimazole and itraconazole against Aspergillus spp
Mycopathologia 123, 135-140, **1993**.
130. Staub. I., Schapoval E.E.S., Bergold A.M.:
Microbiological assay of ketoconazole in shampoo
Int. J. Pharm. 292, 195-199, **2005**.
131. Yoshioka S., Stella V.J.:
Stability of drugs and dosage forms
Kluwer Academic Press/Plenum Press, Nowy Jork, USA **2000**.
132. Kumer K.P., Okonomah A.D., Bradshaw W.G., Soliman K.F.A.:
Stability of ketoconazole in ethanolic solution
Drug Dev. Ind. Pharm. 17. 577-580, **1991**.
133. Thoma K., Kübler N.:
Untersuchung der Photostabilität von Antimykotika 1. Photostabilität von Azolantimykotika [Photodegradation of antimycotic drugs 1. Photodegradation of azole antimycotics]
Pharmazie, 51, 885-893, **1996**.
134. Thoma K., Kübler N.:
Untersuchung der Photostabilität von Antimykotika 2. Photostabilität von Polyenantibiotika [Photostability of antifungal agent 2. Photostability of polyene antibiotics]
Pharmazie, 52, 294-302, **1997**.
135. Thoma K., Kübler N., Reimann E:
Untersuchung der Photostabilität von Antimykotika 3. Photostabilität lokal wirksamer Antimykotika [The photostability of antimycotics 3. Photostability of locally acting antimycotics]
Pharmazie, 52, 362-373, **1997**.
-

-
136. Thoma K., Kübler N.:
Untersuchung der Photostabilität von Antimykotica 4. Photostabilität von Flucytosin und Griseofulvin [Photodegradation of antimycotic drugs 4. Photodegradation of flucytosine and griseofulvin 4]
Pharmazie, 52, 455- 463 **1997**.
137. Thoma K., Kübler N.:
New results in the photostability of antimycotics
Ed.: Albini A., Fasani E. (red.): *Drugs : Photostability and photochemistry*
The Royal Society of Chemistry, Cambridge, Wielka Brytania **1998**.
138. Moffat A.C., Osselton M.D., Widdop B.:
Clarke's Analysis of Drugs and Poisons
Third Edition, Pharmaceutical Press, **2004**.
139. Płaziak A.S.:
Spektrometria masowa związków organicznych
Wydawnictwo Naukowe UAM, Poznań, str. 96-101, **1997**.
140. Marciniak B., Płotkowiak Z., Wachowski L., Kozak M., Popielarz-Brzezińska M.:
Analytical study of β -irradiated antibiotics in the solid state
J. Therm. Anal. Calorim., 68, 423-436, **2002**.
141. Coranni Signoretti E., Volvo L., Fattibene P., Onori S., Pantaloni M.:
Gamma radiation induced effects on cefuroxime and cefotaxime: Investigation on degradation and syn-anti isomerization
Drug. Dev. Ind. Pharm. 20, 2493 – 2508, **1994**.
142. Crawford J.H. Slifkin L.M.:
Point defects in solids
Plenum Press, New York **1975**.
143. Marciniak B., Stawny M., Kozak M., Naskrent M.:
The influence of radiation sterilization on thiamphenicol
Spectrochim. Acta A Mol. Biomol. Spectrosc. 69, 865-870, **2008**.
144. Marciniak B. et al.
Badania własne, niepublikowane.
145. Stawny M.:
Wpływ sterylizacji radiacyjnej na niektóre antybiotyki pochodne 1-fenylopropan-1-olu w fazie stałej
Rozprawa doktorska, Uniwersytet Medyczny im. K. Marcinkowskiego, Poznań, **2010**.
146. Yu S., Lee B., Lee M., Cho I. H., Chang S. W.
Decomposition and mineralization of cefaclor by ionizing radiation: Kinetics and effects of the radical scavengers
Chemosphere, 1, 2106 – 2112, **2008**.
147. Gibella M., Tilquin B.
Detection of the radiolysis of solid ampicillin by UV - spectroscopy
Analysis, 27, 657 – 662, **1999**.
148. Szafran M., Dega-Szafran Z.:
Określanie struktury związków organicznych metodami spektroskopowymi
PWN W-wa **1988**.
-

Wyniki niniejszej pracy były już częściowo opublikowane w następujących czasopismach:

1. Marciniec B., Kozak M., Dettlaff K.:
Thermal analysis in evaluation of the radiochemical stability of some fungicidal drugs
J. Therm. Anal. Cal. 77, 305-317, 2004. (IF: 1,478; MNiSW:9,0)
2. Marciniec B., Dettlaff K., Bafeltowska J.:
Wpływ podstawnika fluorowego na trwałość radiochemiczną niektórych leków pochodnych steroidów i azoli
Ann. Acad. Med. Stetin. 50 suppl. 1, 77-82, 2004. (MNiSW:5,0)
3. Marciniec B., Dettlaff K., Jaroszkiewicz E., Bafeltowska J.:
Radiochemical stability of fluconazole in the solid state
J. Pharm. Biomed. Anal. 43, 1876-1880, 2007. (IF: 2,761; MNiSW:27,0)
4. Marciniec B., Dettlaff K.:
Radiation sterilization of drugs w: Trends in radiation sterilization of health care products
International Atomic Energy Agency, pp. 187-230 Vienna, 2008. (MNiSW:7,0)
5. Marciniec B., Dettlaff K., Naskrent M.:
Influence of ionising irradiation on clotrimazole in the solid state
J. Pharm. Biomed. Anal. 50, 675-678, 2009. (IF: 2,453; MNiSW: 27,0)
Łącznie IF: 6,692; MNiSW: 75,0

oraz prezentowane na konferencjach naukowych (krajowych i zagranicznych):

1. Marciniec B., Kozak M., Dettlaff K.:
Thermal analysis in evaluation of the radiochemical stability of drugs
9th Conference on Calorimetry and Thermal Analysis
31.08- 5.09.2003, Zakopane
Book of abstracts III.C13.
2. Marciniec B., Dettlaff K., Bafeltowska J.:
Badania trwałości radiochemicznej flukonazolu w fazie stałej
Doroczny Zjazd Naukowy PTChem i SITPChem
15-19.09.2003, Lublin
Materiały Zjazdu str. 941.
3. Marciniec B., Dettlaff K.:
Influence of radiation treatment on clotrimazole in the solid state
International Symposium on Pharmaceutical and Biomedical Analysis
8-12.06.2008, Gdańsk
Book of abstracts str. 158.
4. Marciniec B., Dettlaff K., Naskrent M.:
Influence of radiation treatment on ketoconazole in the solid state
9th International Symposium Pharmaceutical Sciences
23-26.06.2009, Ankara
Book of abstracts str. 140

W latach 2008 - 2010 badania były finansowane ze środków Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego – Grant Promotorski nr NN 405 1654 33.